

Verwandtschaftsbeziehungen
innerhalb der
Milchsäurebakterien

Ulrich Schillinger

*Diss
München
1905*

**Verwandtschaftsbeziehungen
innerhalb der
Milchsäurebakterien**

**Dissertation
der Fakultät für Biologie
der Ludwig-Maximilians-Universität
München**

**vorgelegt
von
Ulrich Schillinger
aus
München**

März 1985

1. Berichterstatter: Prof. Dr. O. Kandler
2. Berichterstatter: Prof. Dr. F. Fiedler

Tag der mündlichen Prüfung: 9.7.1935

I N H A L T S V E R Z E I C H N I S

<u>I.</u>	<u>EINLEITUNG</u>	1
<u>II.</u>	<u>MATERIAL UND METHODEN</u>	8
1.	ORGANISMEN	8
2.	STAMMHALTUNG UND REINHEITSKONTROLLE	12
3.	ANZUCHT UND ZELLERNTE	12
4.	NÄHRMEDIEN	12
4.1	MRS-MEDIUM	12
4.2	GRUNDMEDIUM FÜR DIE BESTIMMUNG DES SPEKTRUMS VERGÄRBARER ZUCKER	13
4.3	MEDIUM FÜR L.HETEROHIOCHII	13
4.4	MEDIUM NACH KUNKEE	14
4.5	LC.OENOS-MEDIUM	14
4.6	MEDIUM FÜR L.SANFRANCISCO	14
4.7	TOMATENSAFTMEDIUM	14
4.8	HD-MEDIUM	15
4.9	BACTO-MEDIUM	15
5.	FREISETZUNG VON AMMONIAK AUS ARGININ	16
6.	OPTISCHER MILCHSÄURETEST	16
7.	ACETATBESTIMMUNG	16
8.	ÄTHANOLBESTIMMUNG	16

9.	ZELLWANDUNTERSUCHUNGEN	17
9.1	GEWINNUNG DER ZELLWÄNDE	17
9.2	HYDROLYSE DER GEFRIERGETROCKNETEN ZELLWÄNDE	17
9.3	ANALYSE DER AMINOSÄUREN BZW. PEPTIDE DER ZELLWAND	17
9.3.1	Papierchromatographische Auftrennung	17
9.3.2	Analyse mit Hilfe des Aminosäureanalysators	17
9.4	NACHWEIS VON TEICHONSÄUREN UND POLYSACCHARIDEN	18
10.	UNTERSUCHUNGEN DER ELEKTROPHORETISCHEN BEWEGLICHKEIT DER LDHs	18
10.1	ZELLAUFSCHLUSS	18
10.2	DISC-ELEKTROPHORESE	18
11.	DNA-DNA-HYBRIDISIERUNG UND BESTIMMUNG DES G+C-GEHALTES	19
11.1	ISOLIERUNG DER DNA	19
11.1.1	Isolierung von hochmolekularer DNA	19
11.1.2	Isolierung von niedermolekularer bzw. radioaktiv markierter DNA	20
11.2	BESTIMMUNG DES G+C-GEHALTES	21
11.3	DNA-DNA-Hybridisierung	22
11.3.1	Filtermethode	22
11.3.1.1	Bestimmung der DNA-Menge	22
11.3.1.2	Bestimmung der spezifischen Aktivität	22
11.3.1.3	Denaturierung der DNA	23
11.3.1.4	Beladen von Nitrocellulosefiltern mit hochmolekularer DNA	23
11.3.1.5	Präinkubation der Filter nach Denhardt	24
11.3.1.6	Hybridisierungsansatz	24
11.3.1.7	Berechnung des Prozentsatzes der Homologie	24
11.3.2	Renaturierungsmethode	25
11.3.2.1	Fragmentierung und Konzentrationseinstellung der DNA	25
11.3.2.2	Aufnahme der Renaturierungskinetik	26
11.3.2.3	Berechnung des Prozentsatzes der Homologie	26

12.	DNA-rRNA-HYBRIDISIERUNG	27
12.1	PRÄPARATION RADIOAKTIV MARKIERTER RNA	27
12.1.1	Anzucht und Ernte der Zellen	27
12.1.2	Herstellung des Polyacrylamidgels	27
12.1.3	Zellaufschluß zur Gewinnung des Rohextraktes	29
12.1.4	Elektrophoretische Auftrennung der ^3H -rRNA-Arten	29
12.1.5	Elution der RNA durch Agarosegelelektrophorese	30
12.1.6	Bestimmung der spezifischen Aktivität	31
12.2	DNA-rRNA-HYBRIDISIERUNG	31
12.2.1	Durchführung der Hybridisierung	31
12.2.2	Nachbehandlung der Filter	31
12.2.3	Bestimmung der Schmelzpunkte der DNA-rRNA-Hybride	32
13.	16S rRNA-PARTIALSEQUENZIERUNG	32
13.1	ISOLIERUNG UND REINIGUNG DER 16S rRNA	32
13.2	RNase T_1 -VERDAUUNG UND IN VITRO-MARKIERUNG DER 16S rRNA	33
13.2.1	Spaltung der 16S rRNA mit RNase T_1	33
13.2.2	In Vitro-Markierung der 16S rRNA	33
13.3	BESTIMMUNG DER SEQUENZ DER T_1 -RESISTENTEN 16S rRNA-OLIGONUKLEOTIDE	33
13.3.1	Trennung der Oligonukleotide	34
13.3.2	Isolierung und Spaltung der einzelnen Oligonukleotide	34
13.3.2.1	Isolierung	34
13.3.2.2	Alkali-Spaltung	34
13.3.3	Sequenzierung der Oligonukleotide (Sekundäranalyse)	34
13.3.4	Tertiäre Analyse	35
13.3.4.1	Endgruppenbestimmung	35
13.3.4.2	Eindimensionale Dünnschichtchromatographie	35
13.3.4.3	Homochromatographie zur besseren Auftrennung von sehr langen Fragmenten	36
13.4	BESTIMMUNG DES ÄHNLICHKEITSKOEFFIZIENTEN (S_{AB})	36

III.	<u>ERGEBNISSE</u>	37
1.	VORVERSUCHE ZUR VERBESSERUNG DES WACHSTUMS UND DER LYSE DER ZELLEN	37
1.1	WACHSTUM DER ORGANISMEN AUF VERSCHIEDENEN MEDIEN	37
1.2	VERSUCHE ZUR VERBESSERUNG DER LYSE DER ZELLEN	38
1.2.1	Zugabe von Penicillin während der Anzucht	40
1.2.2	Zugabe von Glycin während der Anzucht	40
1.2.3	Einsatz von "lysing enzymes" (Sigma) anstelle von Lysozym	41
1.2.4	Einsatz von Mutanolysin zusätzlich zu Lysozym	43
2.	TAXONOMISCHE UNTERSUCHUNGEN AN HETEROFERMENTATIVEN LAKTOBAZILLEN (BETABAKTERIEN) UND LEUCONOSTOC-ARTEN	45
2.1	VERWANDTSCHAFTSBEZIEHUNGEN INNERHALB DER BETABAKTERIEN, DIE DEN LYS-ASP-MUREINTYP BESITZEN	45
2.1.1	Physiologische und biochemische Merkmale	45
2.1.1.1	G+C-Gehalt	47
2.1.1.2	Elektrophoretische Beweglichkeit der LDHs	47
2.1.1.3	Zuckervergärungsspektren	47
2.1.2	DNA-DNA-Hybridisierungen	48
2.1.2.1	Zur Bewertung der Renaturierungsmethode	48
2.1.2.2	Hybridisierungsergebnisse	50
2.2.	PHYLOGENETISCHE BEZIEHUNGEN ZWISCHEN HETEROFERMENTATIVEN LACTOBACILLUS- UND LEUCONOSTOC-ARTEN MIT ÄHNLICHEN MUREINCHEMOTYPEN	54
2.2.1	Physiologische und biochemische Merkmale	55
2.2.2	DNA-DNA-Hybridisierungen	55
2.2.2.1	Ergebnisse der Hybridisierungen nach der Filtermethode	55
2.2.2.2	Ergebnisse der Hybridisierungen nach der Renaturierungsmethode	60
2.2.3	Taxonomie der untersuchten Leuconostoc- und Lactobacillus-Arten	62

2.3	IDENTIFIZIERUNG VON BETABAKTERIEN AUS SAUERTEIG UND BIER	69
2.3.1	Heterofermentative Laktobazillen aus Sauerteig	69
2.3.1.1	Physiologische und biochemische Merkmale	69
2.3.1.2	DNA-DNA-Hybridisierungen	71
2.3.2	Isolate aus Bier verschiedener Brauereien	72
2.3.2.1	Physiologische und biochemische Merkmale	73
2.3.2.1.1	Wachstum	73
2.3.2.1.2	Milchsäurebildung und Spektrum an vergärbaren Zuckern	73
2.3.2.1.3	Zellwandchemie	75
2.3.2.1.4	Elektrophoretische Beweglichkeit der LDHs	75
2.3.2.1.5	G+C-Gehaltsbestimmungen	76
2.3.2.2	DNA-DNA-Hybridisierungen	76
3.	VERWANDSCHAFTSBEZIEHUNGEN ZWISCHEN DEN VERSCHIE- DENEN GATTUNGEN DER MILCHSÄUREBAKTERIEN	83
3.1	DNA-rRNA-HYBRIDISIERUNGEN	83
3.1.1	$\Delta Tm_{(e)}$ -Werte	84
3.1.2	Ähnlichkeitsdiagramme	97
3.1.3	Vernetzungsdiagramme	101
3.2	16S rRNA-PARTIALSEQUENZIERUNG	106
IV.	<u>DISKUSSION</u>	112
1.	TAXONOMIE DER HETEROFERMENTATIVEN LAKTOBAZILLEN UND LEUCONOSTOC-ARTEN AUFGRUND VON DNA-DNA-HOMOLOGIESTUDIEN	112
1.1	LACTOBACILLUS-ARTEN, DIE MUREIN DES LYS-ASP-TYPS BESITZEN	112
1.2	LACTOBACILLUS- UND LEUCONOSTOC-ARTEN, DEREN INTERPEPTIDBRÜCKE NICHT AUS ASPARAGINSÄURE BESTEHT	114

2.	DENDROGRAMM DER MILCHSÄUREBAKTERIEN AUF DER GRUNDLAGE DER DNA-rRNA- HYBRIDISIERUNGSERGEBNISSE	117
<u>V.</u>	<u>ZUSAMMENFASSUNG</u>	126
1.	TAXONOMIE DER HETEROFERMENTATIVEN LACTO- BACILLUS- UND LEUCONOSTOC-ARTEN	126
2.	TAXONOMIE DER MILCHSÄUREBAKTERIEN	126
<u>VI.</u>	<u>LITERATURVERZEICHNIS</u>	128

Abkürzungen:

A	Adenin
Ala	Alanin
Asp	Asparaginsäure
ATP	Adenosintriphosphat
C	Cytosin
Cpm	Counts per minute
C2-Verbindung	Verbindung aus 2 Kohlenstoffatomen
CTAB	N-cetyl-N,N,N-trimethylammoniumbromid
DAP	Diaminopimelinsäure
DEAE	Diäthylaminoäthyl-
DNA	Desoxyribonukleinsäure
E.	Escherichia
Ent.	Enterococcus
EDTA	Äthylendiamintetraessigsäure
FDP	Fructose-1,6-diphosphat
G	Guanin
Gly	Glycin
HD	Hefe-Dextrose
L.	Lactobacillus
Lc.	Leuconostoc
LDH	Lactatdehydrogenase
Lys	Lysin
m	meso
MPa	Megapascal
MW	Molekulargewicht
MRS	Medium nach DeMan, Rogosa und Sharpe (1960)
O.D. ₅₇₈	Optische Dichte (bei 578 nm)
Ped.	Pediococcus
rRNA	ribosomale Ribonukleinsäure
RNase	Ribonuklease

S.	Streptococcus
SDS	Natriumdodecylphosphat
Ser	Serin
SSC	Standard-Saline-Citrat (0,15 M NaCl, 0,015 M Na ₃ -citrat)
subsp.	Subspecies
T _m	Schmelzpunkt doppelsträngiger Nukleinsäuren
TEMED	N,N,N'-N-tetramethyl-äthylendiamin
Tris	Tris (hydroxymethyl)aminomethan
U	Uracil

EINLEITUNG

Die Laktobazillen gehören zusammen mit den Streptokokken, Pediokokken und der Gattung *Leuconostoc* zur Gruppe der Milchsäurebakterien, der lebensmitteltechnologisch wohl wichtigsten Bakteriengruppe.

Während Holland (1920) die stäbchenförmigen Milchsäurebakterien in der Gattung *Lactobacillus* zusammenfaßte, gliederte sie Orla-Jensen (1919) in die 3 Gattungen *Thermobacterium*, *Streptobacterium* und *Betabacterium*, die seitdem inoffiziell als Untergattungen verwendet werden. Die ersteren beiden Gattungen bilden die homofermentativen Arten, die Hexosen fast vollständig zu Milchsäure umsetzen (Kluyver, 1935), während die Betabakterien sich durch einen heterofermentativen Gärungstyp auszeichnen, wobei Glucose nicht nur zu Milchsäure vergoren wird, sondern gleichzeitig äquimolare Mengen an CO_2 und einer C2-Verbindung (Acetat oder Äthanol) gebildet werden. Die Betabakterien besitzen keine FDP-Aldolase (Buyze et al., 1957, Williams und Sadler, 1971), können in der Regel Mannit aus Fructose bilden (Eltz et al., 1960) und sind thiaminbedürftig (Rogosa et al., 1961). Strepto- und Thermobakterien werden aufgrund ihrer unterschiedlichen Temperaturoptima und ihrer unterschiedlichen Fähigkeit zur Vergärung von Pentosen (Rogosa und Sharpe, 1959; Rogosa, 1970) unterschieden. Die Streptobakterien zeichnen sich durch die Fähigkeit aus, bei 15°C zu wachsen und Pentosen zu vergären. Die Thermobakterien dagegen zeigen zwar bei 45°C, nicht aber bei 15°C Wachstum und vermögen keine Pentosen zu vergären.

Eine Reihe der in den letzten Jahren entdeckten und beschriebenen Arten lassen sich jedoch nicht nach diesen Kriterien einordnen. So wachsen *L. agilis* (Weiss et al., 1981) und *L. murinus* (Hemme et al., 1982) nicht bei 15°C, vergären aber Ribose, während *L. sharpeae* (Weiss et al., 1981), *L. farciminis*

(Reuter, 1970), *L.yamānashiensis* (Carr und Davies, 1970) und *L.amylophilus* (Nakamura und Crowell, 1979) zwar bei 15°C zu wachsen vermögen, jedoch keine Pentosen angreifen können. In dem 1985 erscheinenden Band II von Bergey's Manual of Systematic Bacteriology werden die Bezeichnungen Thermo-, Strepto- und Betabacterium nicht mehr benützt und eine andere Anordnung der Arten in 3 Gruppen vorgenommen, die die Wachstumstemperatur nicht mehr berücksichtigt. Es wird zwischen obligat homofermentativen, fakultativ heterofermentativen und obligat heterofermentativen Arten unterschieden (Kandler und Weiss, 1985). Erstere bauen Hexosen nach dem Emden-Meyerhof-Schema fast ausschließlich zu Lactat ab, Pentosen und Gluconat werden nicht vergoren. Die fakultativ Heterofermentativen setzen Hexosen in gleicher Weise um, aber unter glucoselimitierenden Bedingungen können einige Arten das intermediär entstehende Pyruvat praktisch vollständig zu Acetat, Äthanol und Formiat abbauen (De Vries et al., 1970). Der wesentliche Unterschied zu den obligat homofermentativen Arten besteht darin, daß Pentosen mit Hilfe einer induzierbaren Pentosephosphoketolase zu Milchsäure und Essigsäure vergoren werden können (Heath et al., 1958). Die obligat Heterofermentativen besitzen ebenfalls eine Phosphoketolase, aber keine FDP-Aldolase und setzen Hexosen zu Milchsäure, Essigsäure (Äthanol) und CO₂, Pentosen zu Milchsäure und Essigsäure um.

Eine Ausnahme stellt *L.bifermentans* dar. Dieser *Lactobacillus* setzt zwar bei Glucoseüberschuß diese homofermentativ weitgehend zu Milchsäure um. Im Gegensatz zu den übrigen Laktobazillen besitzt er aber eine Hydrogenase und kann Lactat unter H₂- und CO₂-Freisetzung zu Acetat und Äthanol abbauen (Pette und van Beynum, 1943; Kandler et al., 1983). Aufgrund der Fähigkeit, bei glucoselimitierenden Bedingungen das gebildete Lactat unter Bildung der oben genannten Produkte gleich weiterzuverwerten, wird er formal den heterofermentativen Laktobazillen zugerechnet, obwohl es sich um einen anderen Gärungsmechanismus handelt.

Daß es sich trotz des Vorkommens einer Hydrogenase um einen Angehörigen der Gattung *Lactobacillus* handelt, geht aus den Ergebnissen der von Stackebrandt et al. (1983) durchgeführten 16s rRNA-Partialsequenzierungen eindeutig hervor (siehe auch Abb. 9).

Es fragt sich, inwieweit die aufgrund von stoffwechselphysiologischen Ähnlichkeiten vorgenommenen Gruppierungen den seit Darwin für die Aufstellung eines natürlichen Systems geforderten genealogischen Verwandtschaften entsprechen. In der sogenannten numerischen Taxonomie versuchte man durch die Sammlung möglichst vieler polygen bestimmter Merkmale die Arten zu Gruppen zusammenzufassen, von denen man hoffte, daß sie gleichzeitig auf echter phylogenetischer Verwandtschaft basierende Gruppierungen darstellten. Eine Möglichkeit, genealogische Verwandtschaften festzustellen, ergab sich aber erst, nachdem man herausgefunden hatte, daß bestimmte polymere Makromoleküle, nämlich Nukleinsäuren und Proteine in gewissem Sinne Aufzeichnungen der Phylogenie darstellen und daß daher durch die Aufklärung von deren Primärstruktur Informationen über die stammesgeschichtliche Entwicklung erhalten werden können (Zuckerkanndl und Pauling, 1965).

Verschiedene bei Bakterien weit verbreitete Proteine wurden daraufhin mit Hilfe von immunologischen Methoden und teilweise auch durch Bestimmung der Aminosäuresequenz untersucht und verglichen (Schwartz und Dayhoff, 1978). Die immunologischen Methoden (vor allem Immundiffusion und Mikrokomplementfixierung) stellen eine Möglichkeit dar, auf relativ schnellem Wege strukturelle Ähnlichkeiten von isofunktionellen Proteinen festzustellen. Allerdings werden dabei im Gegensatz zur Sequenzierung des Proteins nur Regionen auf seiner Außenseite, also nur ein kleiner Teil des Gesamtmoleküls erfaßt und es können nur Proteine miteinander verglichen werden, die in ihrer Aminosäuresequenz weniger als 30 % Unterschiede aufweisen (Prager und Wilson, 1971).

Die Nukleinsäuren verschiedener Organismen können durch Bestimmung des G+C-Gehalts, durch DNA-DNA- und DNA-rRNA-Hybridisierungen sowie DNA- und rRNA-Partial- und -Totalsequenzierungen verglichen werden.

Einen pauschalen Hinweis auf eine genealogische Verwandtschaft geben Bestimmungen des G+C-Gehalts der DNA. 2 Organismen, die sich in ihrem G+C-Gehalt deutlich voneinander unterscheiden, können nicht eng verwandt sein. Umgekehrt muß aber eine Ähnlichkeit in der Basenzusammensetzung der DNA noch keine Ähnlichkeit in der Nukleotidsequenz bedeuten (Bradley, 1965; Mandel, 1969; Kandler und Schleifer, 1980).

Einen indirekten Vergleich der Basensequenzen der DNA verschiedener Organismen ermöglicht die DNA-DNA-Hybridisierung. Mit Hilfe dieser Methode können aber nur relativ enge Verwandtschaften erkannt werden (Schleifer und Stackebrandt, 1983). Sie ermöglicht eine eindeutige Zuordnung von Stämmen zu einer Art. Man geht davon aus, daß bei einer über 70 %igen DNA-DNA-Homologie die Stämme als Vertreter ein- und derselben Art angesehen werden können (Brenner, 1973; Johnson, 1973). Homologiewerte über 20 % deuten nach Schleifer und Stackebrandt (1983) auf eine Zugehörigkeit zur gleichen Gattung. Sobald 2 Stämme aber größere Unterschiede in ihrem Genom aufweisen, wie es z. B. bei Vertretern verschiedener Gattungen oder nur sehr entfernt verwandten Arten der Fall ist, kann ihr Verwandtschaftsgrad mit dieser Hybridisierungsmethode nicht mehr erfaßt werden. In solchen Fällen werden unabhängig vom echten Verwandtschaftsgrad niedrige Homologiewerte (bei der Filtermethode unter 15 %) gefunden, die keine Aussagekraft mehr besitzen.

Eine Möglichkeit, solche entfernteren Verwandtschaften zu untersuchen, bietet die DNA-rRNA-Hybridisierung (Schleifer und Stackebrandt, 1983). Während bei der DNA-DNA-Hybridisierung das ganze Genom der Organismen verglichen wird, betrachtet man bei der DNA-rRNA-Hybridisierung nur die rRNA-Cistronen, die etwa 0,3 - 0,5 % des gesamten Genoms ausmachen (Kohne, 1968).

Da sich die rRNA-Sequenzen im Verlauf der Evolution konservativer verhalten haben als die meisten übrigen Gene (Schwarz und Kössel, 1980; Fox et al., 1980), können mit dieser Methode auch phylogenetische Beziehungen weiter entfernt verwandter Organismen (oberhalb des Artniveaus, etwa Gattungen und Familien) aufgedeckt werden.

Die Klärung der verwandtschaftlichen Beziehungen von Organismen auf noch höherem taxonomischen Niveau ermöglicht neben der 5S rRNA-Totalsequenzierung die 16S rRNA-Partialsequenzierung. Die Sequenzen von 16S rRNA-Oligonukleotiden werden miteinander verglichen, und die Ähnlichkeit wird durch einen Assoziationskoeffizienten, den sogenannten S_{AB} -Wert ausgedrückt (Fox et al., 1977). Dieser kann als Grundlage für ein mit Hilfe der Clusteranalyse konstruiertes Dendrogramm verwendet werden. Als Beispiel für ein solches Dendrogramm ist in Abbildung 1 der sogenannte "Clostridienzweig" der gram-positiven Eubakterien dargestellt, dem auch die Milchsäurebakterien angehören.

Die genealogische Verwandtschaft der Milchsäurebakterien wurde bisher nur zum Teil untersucht. Es existieren eine Reihe von DNA-DNA-Homologiestudien (u. a. von Dellaglio et al., 1973, 1975, 1981; Sharpe und Dellaglio, 1977; Gasser und Janvier, 1980, Vescovo et al.; 1979; Hontebeyrie und Gasser, 1977; Garvie, 1976; Back und Stackebrandt, 1978; Kilpper-Bälz et al., 1982) und auch vergleichende immunologische Untersuchungen an ausgewählten Enzymen von Vertretern dieser Bakteriengruppe (z. B. Malatenzym, D-LDH, Glycerinaldehyd-3-phosphatdehydrogenase, FDP-Aldolase). Die Ergebnisse immunologischer Studien von London et al. (1971, 1973 und 1983), Gasser und Gasser (1971) und von Hontebeyrie und Gasser (1975) gaben Hinweise auf eine enge phylogenetische Verwandtschaft von Laktobazillen, Leuconostoc, Pediokokken und Streptokokken.

Auch aus den S_{AB} -Bestimmungen, die Stackebrandt et al. (1983) an einer Reihe von Laktobazillen, *Pediococcus pentosaceus* und *Leuconostoc mesenteroides* durchführten, kann man auf die Abstammung der Milchsäurebakterien von einem gemeinsamen Vorläufer schließen. Allerdings ergibt die Unterteilung der Milchsäurebakterien aufgrund der S_{AB} -Werte verschiedener Vertreter ein von der bisherigen Differenzierung aufgrund von physiologischen Merkmalen abweichendes Bild. So durchmischen sich in dem entstehenden Dendrogramm heterofermentative Laktobazillen mit homofermentativen Arten und Pediokokken (siehe Abb. 9).

Das Ziel der vorliegenden Arbeit war es nun, mit Hilfe von DNA-DNA- und DNA-rRNA-Hybridisierungen das besonders bezüglich der heterofermentativen Laktobazillen noch unvollständige Bild der phylogenetischen Verwandtschaftsverhältnisse der Milchsäurebakterien zu vervollständigen und zu ergänzen.

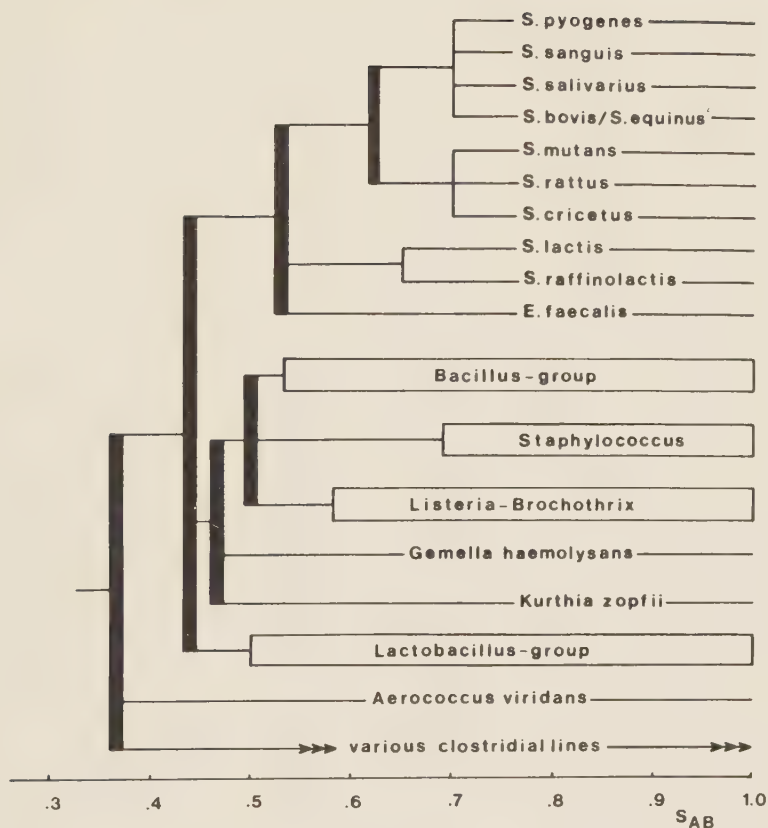


Abb. 1: "Clostridien"-Zweig der gram-positiven Eubakterien, abgeleitet von den vergleichenden Untersuchungen der 16S rRNA (nach Stackebrandt).

II. MATERIAL UND METHODEN

1. ORGANISMEN

In den Tabellen 1 und 2 sind die in die Untersuchungen einbezogenen Stämme aufgeführt.
(Typstämme wurden mit * bezeichnet)

Tab. 1: Untersuchte Stämme

Art	Bezeichnung	Herkunft	isoliert aus:
<i>L.acidophilus</i>	4913	ATCC	-
<i>L.agilis</i>	20509 *	DSM	Städt. Abwasser
	262	Weiss	Städt. Abwasser
<i>L.alimentarius</i>	20249 *	DSM	marinierte Fleisch- erzeugnisse
<i>L.amylophilus</i>	20533 *	DSM	Getreideabfall zur
<i>L.amylovorus</i>	20531 *	DSM	Schweinemast
<i>L.animalis</i>	20602 *	DSM	Zahnplaque (Pavian)
<i>L.batatas</i>	15520	ATCC	Süßkartoffeln
<i>L.bif fermentans</i>	20003 *	DSM	Käse
<i>L.brevis</i>	20054 *	DSM	Faeces
<i>L.buchneri</i>	20057 *	DSM	Tomatenmark
<i>L.casei</i>	20011 *	DSM	Käse
subsp.alactosus	20020 *	DSM	Speichel (Mensch)
subsp.rhamnosus	20021 *	DSM	-
<i>L.collinoides</i>	27612 *	ATCC	Apfelsaft
<i>L.confusus</i>	20196 *	DSM	Zuckerrohr
	20194	DSM	Rübenmaische
<i>L.coryniformis</i>	20001 *	DSM	Silage
<i>L.curvatus</i>	20010	DSM	Stall-Luft
<i>L.delbrueckii</i>	20074 *	DSM	Kornmaische
<i>L.divergens</i>	20623 *	DSM	Fleischwaren
<i>L.fermentum</i>	20052 *	DSM	vergorene Rüben
<i>L.frigidus</i>	20173	DSM	Brauereihefe
<i>L.fructivorans</i>	20203 *	DSM	Maionnaise

Art	Bezeichnung	Herkunft	isoliert aus:
<i>L. fructosus</i>	20349 *	DSM	Pflanzen
<i>L. gasserii</i>	20243 *	DSM	Mensch
<i>L. halotolerans</i>	20190 *	DSM	Fleischwaren
<i>L. heterohiochii</i>	20350 *	DSM	verdorbenes Sake
	20353	DSM	verdorbenes Sake
<i>L. hilgardii</i>	20176 *	DSM	Wein
<i>L. jensenii</i>	20557 *	DSM	Vagina (Mensch)
<i>L. kandleri</i>	20593 *	DSM	Wüstenquelle (Namib)
<i>L. kefir</i>	20485	DSM	Kefir
	20587 *	DSM	Kefir
	E 40	Kunath	Kefir
<i>L. malefermentans</i>	11306	ATCC	Bier
<i>L. maltaromicus</i>	20342 *	DSM	Milch
<i>L. minor</i>	20014 *	DSM	Melkmaschinenschleim
<i>L. murinus</i>	20452 *	DSM	Verdauungstrakt (Ratte)
<i>L. parvus</i>	20177	DSM	Bier
<i>L. pastorianus</i>	20197	DSM	Bier
<i>L. plantarum</i>	20174 *	DSM	Kraut
<i>L. reuteri</i>	20016 *	DSM	Verdauungstrakt (Mensch)
	20056	DSM	Faeces (Ratte)
	20059	DSM	Verdauungstrakt (Mensch)
<i>L. ruminis</i>	20403 *	DSM	Pansen (Rind)
<i>L. salivarius</i>	20554 *	DSM	Speichel (Mensch)
<i>L. sanfrancisco</i>	20451 *	DSM	Sauerteig
<i>L. sharpeae</i>	20505 *	DSM	Städt. Abwasser
	104	Weiss	Städt. Abwasser
<i>L. trichodes</i>	1985	NCDO	Wein
<i>L. vaccinosus</i>	20634 *	DSM	Rindermist
<i>L. viridescens</i>	20410 *	DSM	Melkmaschinenschleim
<i>L. vitulinus</i>	20405 *	DSM	Pansen (Kalb)
<i>L. yamanashiensis</i>	20444 *	DSM	Apfelsaft
<i>L. spec.</i>	I CH ₄	Weiss	Städt. Abwasser

Art	Bezeichnung	Herkunft	isoliert aus:
Lc.cremoris	20346 *	DSM	Säurewecker
= Lc.mesenteroides subsp.cremoris	20200	DSM	Säurewecker
Lc.dextranicum	20484 *	DSM	-
= Lc.mesenteroides subsp.dextranicum			
Lc.lactis	20202 *	DSM	Milch
	533 *	NCDO	Milch
	20192	DSM	Käse
	2037	NCDO	-
Lc.paramesenteroides	20288 *	DSM	-
	20186	DSM	Molkereiluft
	871	NCDO	-
Lc.paramesenteroides subsp. "lactophilum"	20185	DSM	-
	20201	DSM	Säurewecker
Lc.mesenteroides	20343 *	DSM	Olive (fermentiert)
	20193	DSM	Zuckerlösung
Lc.mesenteroides subsp."amelibiosum"	20188	DSM	-
	10882	ATCC	Zuckerlösung
Lc.oenos	20252 *	DSM	Wein
Lc.spec.	20189	DSM	Sauerkraut
Ped.acidilactici	20284	DSM	Gerste
Ped.damnosus	20331 *	DSM	Bier
S.bovis	20480 *	DSM	Rindermist
S.faecalis	20478 *	DSM	-
= Enterococcus faecalis			
S.lactis	20481 *	DSM	Quark
S.mutans	20523 *	DSM	kariöse Zähne
S.sanguis	20567 *	DSM	Bakter. Endocarditis

Tab. 2: Laktobazillenisolat aus Sauerteig und Bier

Stämme	Herkunft	isoliert aus:
242-1; 242-2; 73	Spicher	Sauerteig
KPA, IV 1c, IV 9d, IXA 1b, IX 2b, IXA 3a, IX 5g, IX 6a, IX 7a, IX 7g, IX 8h, IX 9a, IX 9b, IX 10b, IX 10g, X 3i, X 7g, X 8h, XIA 1d, XIA 1g, XIA 2h, XIA 3b, XIA 3d, XI 9f, MO 67/2, MO 67/3, MO 67/4, MO 67/5, MOO 4/2, MO 38/2	Back	Bier

Abkürzungen:

DSM: Deutsche Sammlung von Mikroorganismen,
Göttingen

NCDO: National Collection of Dairy Organisms, Reading,
England

ATCC: American Type Culture Collection, Rockville, MD,
USA

Back, W. Döhler GmbH, Darmstadt

Kunath, P. Botanisches Institut der Universität München

Spicher, G. Bundesforschungsanstalt für Getreide- und Kar-
toffelverarbeitung, Detmold

Weiss, N. Deutsche Sammlung von Mikroorganismen, GBF
Braunschweig-Stöckheim

Im Folgenden werden die Stammmummern ohne Nennung der
Herkunft verwendet.

2. STAMMHALTUNG UND REINHEITSKONTROLLE

Die Stämme wurden im Agarstich bei 4°C aufbewahrt und alle 4 - 5 Wochen in frisches Medium überimpft. Die Reinheitskontrolle erfolgte mikroskopisch bzw. durch Anlegen von Verdünnungsausstrichen. Außerdem wurde die Identität aller Stämme nach Erhalt durch Überprüfen des Spektrums an vergärbaren Zuckern kontrolliert.

3. ANZUCHT UND ZELLERTE

Das Wachstum wurde durch Messung der optischen Dichte im Eppendorfphotometer bei 578 nm gegen das entsprechende Medium verfolgt. Die Zellernte erfolgte je nach Volumen in einer Durchlaufzentrifuge (Westfalia-Separator) unter Eiszusatz zum Abbruch des Wachstums oder in einer Becherzentrifuge (Runne-Zentrifuge). Das Sediment wurde nach dem Waschen mit Leitungswasser und dem Puffer der nachfolgenden Verarbeitung bei -20°C eingefroren.

4. NÄHRMEDIEN

Alle Mengenangaben beziehen sich auf 1 l.

4.1 MRS-MEDIUM (de Man et al., 1960)

Pepton aus Casein, tryptisch verdaut (Merck)	10 g
Fleischextrakt (Merck)	2 g
Hefeextrakt (Oxoid)	5 g
oder	
Cenovis-Hefeextrakt	7 g
Glucose	10 g
$K_2HPO_4 \times 3H_2O$	10 g

Na-acetat x 3H ₂ O	5 g
Diammoniumcitrat	2 g
MgSO ₄ x 7H ₂ O	0,2 g
MnSO ₄ x 4H ₂ O	0,05 g
Cystein-hydrochlorid	0,5 g
Tween 80	1 ml
Agar	10 g
pH 6,4 - 6,5 bzw. pH 5,3 - 5,5	

4.2 GRUNDMEDIUM FÜR DIE BESTIMMUNG DES SPEKTRUMS VERGÄRBARER ZUCKER (Sharpe, 1962)

Zu MRS-Medium ohne Fleischextrakt und Glucose wurde 0,004 % Chlorphenolrot als Indikator zugegeben. Die verschiedenen Zucker wurden dem autoklavierten Grundmedium als sterilfiltrierte 10 %-ige Lösungen zugesetzt (Endkonzentration : 0,5 %).

4.3 MEDIUM FÜR L.HETEROHIOCHII

Pepton aus Casein, tryptisch verdaut (Merck)	10 g
Fleischextrakt (Merck)	5 g
Glucose	20 g
KH ₂ PO ₄	0,5 g
K ₂ HPO ₄ x 3H ₂ O	0,5 g
FeSO ₄ x 7H ₂ O	10 mg
MgSO ₄ x 7H ₂ O	200 mg
MnSO ₄ x 4H ₂ O	7,5 mg
Na-acetat x 3H ₂ O	20 g
DL-Mevalonsäure	30 mg
Äthanol	40 ml
Tween 80	1 ml
pH 5,2	

4.4 MEDIUM NACH KUNKEE (Garvie et al., 1974)

Trypton (Difco)	20 g
Hefeextrakt (Difco)	5 g
Pepton (Difco)	5 g
Glucose	5 g
Tomatensaft (im Handel erhältlich, filtriert)	250 ml
Tween 80	0,5 ml
pH 5,5	
nach dem Autoklavieren wurden pro 5 ml Medium 0,88 ml Äthanol (95 %) zugesetzt.	

4.5 LC.OENOS-MEDIUM

Pepton aus Casein, tryptisch verdaut (Merck)	10 g
Hefeextrakt (Oxoid)	5 g
Glucose	10 g
Fructose	5 g
$\text{MgSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$	0,2 g
$\text{MnSO}_4 \times 4\text{H}_2\text{O}$	0,05 g
Diammoniumcitrat	3,5 g
Tomatensaft (filtriert)	100 ml
Cystein-hydrochlorid	0,5 g
Tween 80	1 ml
pH 4,8	

4.6 MEDIUM FÜR L.SANFRANCISCO

Pepton aus Casein, tryptisch verdaut (Merck)	10 g
Fleischextrakt	2 g
Maltose	20 g
Hefeextrakt (Oxoid)	3 g
frischer Hefekochsaft*	30 ml
$\text{Na-acetat} \times 3\text{H}_2\text{O}$	5 g
KH_2PO_4	2 g
$\text{MgSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$	0,2 g
$\text{MnSO}_4 \times 4\text{H}_2\text{O}$	0,05 g

pH 5,6 - 5,8

* Herstellung des frischen Hefekochsafts: 20 %ige Suspension von Bäckerhefe wird in destilliertem Wasser 30 Min. bei 121°C autoklaviert. Man läßt die Suspension sich über Nacht bei 4°C absetzen, dekantiert ab und zentrifugiert den Überstand.

7

TOMATENSAFTMEDIUM

Trypton (Oxoid)	10 g
Hefeextrakt (Oxoid)	10 g
Tomatensaft (filtriert)	200 ml
Cystein-hydrochlorid	0,5 g
Tween 80	1 ml
pH 6,5	

8

HD-MEDIUM

Trypton (Oxoid)	10 g
Hefeextrakt (Oxoid)	5 g
Glucose	5 g
pH 7,3	

9

BACTO-MEDIUM

Hefeextrakt (Oxoid)	5 g
Pepton aus Casein (Merck)	8,5 g
Glucose	2,5 g
Lactose	2,5 g
$K_2HPO_4 \times 3H_2O$	2,5 g
NaCl	5 g
Fleischpepton (Difco)	2 g
pH 7,3	

5. FREISETZUNG VON AMMONIAK AUS ARGININ

Die Bildung von Ammoniak aus Arginin durch Milchsäurebakterien wurde mit Neßlers Reagenz nachgewiesen.

6. OPTISCHER MILCHSÄURETEST

Die Bestimmung von L-Lactat (Gutmann und Wahlefeld, 1974) und D-Lactat (Gawehn und Bergmeyer, 1974) erfolgte enzymatisch mit Hilfe des optischen Tests. Es wurden dabei die L-LDH aus Kaninchenmuskel (Boehringer) und D-LDH aus Lc. mesenteroides (hergestellt nach Dennis, 1962) verwendet.

7. ACETATBESTIMMUNG

Die Acetatbestimmung erfolgte photometrisch mit Acetatskinase (Boehringer) nach Holz und Bergmeyer (1974).

8. ÄTHANOLBESTIMMUNG

Äthanol wurde photometrisch mit Aldehyddehydrogenase und Äthanoldehydrogenase (Boehringer) nach Beutler und Michal (1977) bestimmt.

9. ZELLWANDUNTERSUCHUNGEN

9.1 GEWINNUNG DER ZELLWÄNDE

Die Zellwände wurden nach der Methode von Schleifer und Kandler (1967) gewonnen.

9.2 HYDROLYSE DER GEFRIERGETROCKNETEN ZELLWÄNDE

Zur Partialhydrolyse wurden die Zellwände 30 Min., zur Totalhydrolyse 16h bei 100°C in 4N HCl inkubiert.

9.3 ANALYSE DER AMINOSÄUREN BZW. DER PEPTIDE DER ZELLWÄNDE

9.3.1 Papierchromatographische Auftrennung

Nach dem Abblasen der HCl wurden die Hydrolysate auf Chromatographiepapier Schleicher und Schüll 2043b aufgetragen und absteigend mit den Fließmitteln Isopropanol/Wasser/Eisessig = 75/10/15 und Picolin/Wasser/Ammoniak = 70/28/2 2-dimensional chromatographiert. Der Test auf Diaminopimelinsäure (DAP) erfolgte im Laufmittel von Rhuland (1955) (Methanol/Pyridin/10N HCl/Wasser = 320/40/10/70 unter Mitführung eines m-DAP-Standards (18h). Die Chromatogramme wurden mit Ninhydrinreagenz besprüht und einige Minuten bei 100°C entwickelt.

9.3.2 Analyse mit Hilfe des Aminosäureanalysators

Die Aminosäurezusammensetzung der Zellwände wurde mit Hilfe des Aminosäureanalysators von Beckmann (Modell 120 c) untersucht.

9.4 NACHWEIS VON TEICHONSÄUREN UND POLYSACCHARIDEN

Die Extraktion der Teichonsäuren und Polysaccharide erfolgte nach der Methode von Fiedler et al. (1981). Nach Hydrolyse der HF-Extrakte (2N HCl, 3h, 100°C) wurden die Zucker und Zuckeralkohole als die entsprechenden Alditolacetatderivate (Albersheim et al., 1967) gaschromatographisch nachgewiesen.

10. UNTERSUCHUNG DER ELEKTROPHORETISCHEN BEWEGLICHKEIT DER LDHs

10.1 ZELLAUFSCHLUSS

Ca. 2 g eingefrorene Zellen wurden in 2 ml Aufschlußpuffer (0,1M Acetat pH6,5 mit 10 mM Mercaptoäthanol) suspendiert und mit Hilfe der French-press (Aminco) bei 138 MPa aufgeschlossen. Nach dem Abzentrifugieren der noch ganzen Zellen und Zellwände wurde der Überstand = Rohextrakt entweder sofort aufs Gel aufgetragen oder eingefroren (-20°C).

10.2 DISC-ELEKTROPHORESE

Die Elektrophorese im Polyacrylamidgel zur Bestimmung der elektrophoretischen Beweglichkeit der LDHs wurde nach Maurer (1968), modifiziert nach Stetter (1973) durchgeführt. Auf das 7,5 %ige Gel wurden nach einem kurzen Vorlauf bei 10 mA und 130 V 20 µl einer Mischung aus Rohextrakt (50µl), einer 0,1 %igen Bromphenolblaulösung (10 µl) und einer Spatelspitze Saccharose aufgetragen. Als Referenz wurde jeweils eine 1 : 50 verdünnte Lösung einer Kristallsuspension von L-Lactatdehydrogenase iso I aus Kaninchenmuskel (Boehringer) mit aufgetragen. Durch Co-elektrophorese mit dieser Kaninchen-LDH sollte eine genauere Auswertung der Laufstrecken erreicht werden.

Die Elektrophorese wurde bei einer Stromstärke von 15 mA durchgeführt und sobald die Bromphenolblaubande das Gelende erreicht hatte, abgebrochen. Die Gele wurden anschließend in entsprechenden Reaktions- bzw. Entwicklerlösungen inkubiert.

a) unphysiologische Richtung:

pro Gel 9 mg NAD
9 mg D- oder L-Lactat
6 ml Entwicklerlösung
42 mg Nitroblau-tetrazolium,
4,2 mg Phenazinmethosulfat
60 ml Tris 0,1 M, pH 8,4

b) physiologische Richtung:

zuerst Inkubation in ca. 6 ml Imidazolpuffer (0,1 M, pH 6,5)
+ 6 mg NADH + H^+
+ 10 mg Pyruvat
danach Sichtbarmachen der Banden in Entwicklerlösung
18 mg Nitroblau-tetrazolium
3 mg Phenazinmethosulfat
9 ml Tris 0,1 M, pH 8,4

DNA-DNA-HYBRIDISIERUNG UND BESTIMMUNG DES G+C-GEHALTS

ISOLIERUNG DER DNA

(modifiziert nach Stackebrandt und Kandler, 1979)

Isolierung von hochmolekularer DNA

Die in der logarithmischen Phase geernteten Zellen einer 15I-Kultur wurden mit Leitungswasser und Saline-EDTA-Puffer pH 8,0 gewaschen und in demselben Puffer mit Lysozym inkubiert.

Nach erfolgter Lyse der Zellen wurde die Suspension mit 25 %iger SDS-Lösung auf 2 % SDS gebracht, im Wasserbad 20 Min. auf 60°C erwärmt und nach dem Abkühlen auf eine Na^+ -Konzentration von 1 M gebracht. Es folgten 2 Chloroformausschüttelungen und eine anschließende Isopropanolfällung (0,56-faches Volumen). Der Niederschlag wurde in 0,1 x SSC gelöst und mit 10 x SSC auf eine Konzentration von 1 x SSC gebracht. Nach Zusatz von 5M NaCl (ad 1molar) und 4 %igem CTAB (ad 1 %) wurden die CTAB-Salze der DNA durch Zutropfen von bidestilliertem Wasser ausgefällt und nach dem Abzentrifugieren in 1M NaCl gelöst. Die DNA wurde wiederum mit Isopropanol ausgefällt und auf einen Glasstab gewickelt. Nach dem Lösen der DNA in 0,1 x SSC wurde mit 10 x SSC eine Konzentration von 1 x SSC eingestellt und jeweils mindestens 6h mit RNase A (Merck) und Proteinase K (Serva) bei 37°C geschüttelt. Anschließend wurde nochmals eine Chloroformausschüttelung vorgenommen und die DNA unter Wickeln mit Isopropanol ausgefällt, und nach dem Lösen in 0,1 x SSC wurde mit 10 x SSC eine Konzentration von 1 x SSC eingestellt. Zuletzt wurde die DNA-Lösung gegen 1 x SSC mit 0,02M EDTA (2 - 3 Tage) bzw. für spektralphotometrische Messungen gegen 1 x SSC mit 0,01M EDTA (1 Tag) und gegen 1 x SSC (1 Tag) dialysiert. Zur Reinheitskontrolle wurden DNA-Spektren im Bereich von 220 bis 340 nm aufgenommen. Die Lösungen wurden mit einem Tropfen Chloroform versetzt und bei 4°C aufbewahrt.

11.1.2 Isolierung von niedermolekularen bzw. radioaktiv markierter DNA

Für die DNA-DNA-Hybridisierungen nach der Renaturierungsmethode ist keine hochmolekulare DNA erforderlich, so daß man die Zellen bis zur stationären Phase wachsen und mechanisch mit der French-press aufschließen kann. Dasselbe gilt auch für die ^3H -markierte DNA, die für die Hybridisierungen nach der Filtermethode verwendet werden soll.

Im Falle der markierten DNA wurden die Zellen in einem Medium mit 1 mCi/l ($6\text{-}^3\text{H}$)-Thymidin angezogen und geerntet, sobald keine weitere Thymidinaufnahme mehr erfolgte. Nach dem Aufbrechen der Zellen mit Hilfe der French-press wurden die Zellwände abzentrifugiert und die im Überstand vorhandene DNA mit CTAB gefällt. Alle weiteren Reinigungsschritte waren dieselben wie bei der Isolierung hochmolekularer DNA.

Vor den DNA-DNA-Hybridisierungen wurde die DNA durch 3-malige Passage in der French-press-Zelle bei 138 MPa zu gleichmäßig langen Stücken fragmentiert.

.2

BESTIMMUNG DES G+C-GEHALTES

Der molare Guanin+Cytosin-Gehalt der DNA wurde durch die Bestimmung des Schmelzpunktes der DNA nach Mandel und Marmur (1968) in einem Gilford-2600-Spektralphotometer mit Thermoküvette ermittelt.

Dazu wurde die Extinktionszunahme, die aufgrund des hypochromen Effektes beim Erhitzen doppelsträngiger DNA bei 260 nm auftritt, verfolgt und mit Hilfe eines Schreibers (Plotter 7225A, Hewlett Packard) aufgezeichnet. Anschließend wurde der T_m , d. h. die Temperatur, bei der die halbmaximale Extinktionsänderung erreicht wurde, graphisch ermittelt. In 1 x SSC gilt für die Berechnung des G+C-Gehaltes nach de Ley (1970) folgende Formel: $\text{mol \% G+C} = (T_m - 69,4) \times 2,44$

Als Referenz wurde bei allen G+C-Bestimmungen E.Coli-DNA (Sigma) ($T_m = 90,7^\circ\text{C}$) mitgeführt, und die erhaltenen T_m -Werte der Proben wurden entsprechend korrigiert.

11.3 DNA-DNA-HYBRIDISIERUNG

11.3.1 Filtermethode

11.3.1.1 Bestimmung der DNA-Menge (Burton, 1968)

Die in einer Probe vorliegende bzw. an ein Filter gebundene DNA-Menge läßt sich mit Hilfe einer Farbreaktion mit Diphenylreagenz ermitteln.

Dazu wurden 0,5 ml der DNA-haltigen Probe (bzw. 1 Minifilter + 0,5 ml H₂O bidest.) mit 0,5 ml 1N HClO₄ versetzt und im Wasserbad 20 Min. auf 70°C erhitzt. Nach dem Abkühlen wurden 2 ml Diphenylreagenz zugegeben, und nach 18 h Inkubation bei 30°C im Dunkeln wurden die Extinktionen bei 578 nm gegen den Leerwert gemessen. Als Standardlösung zur Aufstellung einer Eichkurve wurde Lachsspermien-DNA (Serva) (0,3 mg/ml 0,005M NaOH) verwendet.

Zusammensetzung des Diphenylreagenz: 1,5 g Diphenylamin (Merck) gelöst in 100 ml Eisessig und 1,5 ml konz. Schwefelsäure. Vor Gebrauch wurden pro 20 ml Reagenz 0,1 ml einer 1,6 %igen wässrigen Acetaldehydlösung zugegeben.

11.3.1.2 Bestimmung der spezifischen Radioaktivität

Wasserhaltige Proben wurden mit H₂O bidest. auf 1 ml aufgefüllt und im Szintillationsgefäß mit 10 ml tritonhaltigem Cocktail im Packard-Szintillationszähler gemessen. Aus den Cpm (= Counts per minute) und dem DNA-Gehalt der Probe wurde die spezifische Radioaktivität im Cpm/µg DNA ermittelt. Minifilter wurden in 4 ml Cocktail für wasserfreie Proben gemessen.

11.3.1.3 Denaturierung der DNA

Da für die Hybridisierungsreaktion die DNA in Form von Einzelsträngen vorliegen muß, ist es notwendig, sowohl die markierte als auch die hochmolekulare unmarkierte DNA zu denaturieren.

Die markierte DNA wurde in 3 x SSC und 10 % Formamid durch 2-maliges Erhitzen auf 100°C thermisch denaturiert. Um eine Reassoziaton der Einzelstränge zu verhindern, wurde die DNA-Lösung jeweils sofort in Eiswasser abgekühlt.

Die hochmolekulare DNA wurde alkalisch denaturiert (Birnstiel et al., 1972). Dazu wurde die DNA-Lösung mit dem gleichen Volumen an 1N NaOH versetzt, und nach 20-minütiger Inkubation bei Raumtemperatur wurde das vierfache Volumen an eiskaltem Puffer (3M NaCl : 1 N HCl : 1M Tris = 2 : 1 : 1) zugegeben. Mit 6N HCl wurde unter Eiskühlung ein pH-Wert von 7,0 eingestellt.

11.3.1.4 Beladen von Nitrocellulosefiltern mit hochmolekularer DNA

Die zu beladenden Nitrocellulosefilter (Sartorius, Porenweite 0,2 µm) wurden 15 Min. in 3 x SSC eingeweicht und dann auf der Filterbank mit 3 x SSC gewaschen. Danach wurde die alkalisch denaturierte DNA-Lösung (666 µg pro Filter mit Ø 50 mm) mit einer Geschwindigkeit von ca. 0,2 ml pro Min. durch die Filter gesaugt. Anschließend wurde noch 2 mal mit 3 x SSC nachgespült. Die beladenen Nitrocellulosefilter wurden über Nacht bei Raumtemperatur und danach 4 h bei 80°C im Vakuum getrocknet und daraufhin bei 4°C im Exsiccator aufbewahrt. Für die Hybridisierungen wurden aus diesen Filtern mit einer Perforette Minifilter (Ø 5,5 mm) gestanzt.

11.3.1.5 Präinkubation der Filter nach Denhardt (1966)

Um die unspezifische Adsorption radioaktiver DNA an freigebliebene Stellen der beladenen Filter zu verhindern, wurden die Minifilter vor der DNA-DNA-Hybridisierung mit Denhardt-Reagenz inkubiert (je 0,5 ml, 4h, bei Hybridisierungstemperatur: T_m - 25°C).

Denhardt-Reagenz: 0,02 % Ficoll (MW 400000) (Sigma)
0,02 % Polyvinylpyrrolidon (MW 360000) (Sigma)
0,02 % Rinderserumalbumin (Sigma)
gelöst in 3 x SSC

11.3.1.6 Hybridisierungsansatz

Nach dem Absaugen der Denhardt-Lösung wurden die Minifilter mit je 0,2 ml einer Lösung bedeckt, die die denaturierte markierte DNA in einer Konzentration von 1 µg/ml in 3 x SSC und 10 % Formamid enthielt. Nach McConaughy et al. (1969) wird der Schmelzpunkt T_m der DNA durch Zugabe von 1 % Formamid um 0,72°C herabgesetzt. Nach 24 h Inkubation bei 60°C im Wasserbad wurde die Lösung abgesaugt. Die Minifilter wurden 1 mal mit 3 x SSC gewaschen und danach im Vakuum bei 80°C getrocknet. Die gebundene Radioaktivität wurde anschließend im Szintillationszähler gemessen.

11.3.1.7 Berechnung des Prozentsatzes der Homologie

Der prozentuale Anteil der markierten DNA, der an das Filter gebunden hatte, wurde folgendermaßen berechnet:

$$\% \text{ gebundene DNA} = \frac{\text{Cpm pro Filter}}{\text{Cpm der eingesetzten mark. DNA}} \times 100$$

Für die Berechnung des Prozentsatzes der Homologie wurde folgende Formel benutzt: .

$$\% \text{ Homologie} = \frac{\% \text{ gebund.mark.DNA am heterologen Filter}}{\% \text{ gebund.mark.DNA am homologen Filter}} \times 100$$

Für Filter mit unterschiedlicher Bindungsqualität wurde eine entsprechende Korrektur der Homologiewerte vorgenommen.

11.3.2 Renaturierungsmethode (de Ley, 1970)

Dieses Verfahren beruht auf einer spektrophotometrischen Messung der Reassoziations der DNA.

Dazu muß die doppelsträngige DNA durch Erhitzen in ihre Einzelstränge zerlegt werden, welche bei geeigneten Bedingungen wieder miteinander reassoziieren können. Diese Renaturierung folgt nach Gillis et al. (1970) eine gewisse Zeit einer Reaktion 2. Ordnung und ist somit proportional dem Anteil an gepaarten, d. h. homologen DNA-Fragmenten. Die DNA-DNA-Homologien zwischen 2 Stämmen können dann durch den Vergleich der Renaturierungsgeschwindigkeiten, die sich im homologen bzw. heterologen System ergeben, ermittelt werden.

11.3.2.1 Fragmentierung und Konzentrationseinstellung der DNA

Nach de Ley (1970) liefern DNA-Fragmente von einem Molekulargewicht von etwa 400000 Dalton, wie man sie nach einer French-press-Passage erhält, die am besten reproduzierbaren Renaturierungsdaten.

Daher wurde die DNA zunächst 3 mal bei 138 MPa mit der French-press fragmentiert und anschließend 24 h gegen 2 x SSC dialysiert. Um die DNA-Lösungen auf eine gemeinsame Konzentration von 45 µg/ml zu bringen, wurde mit 2 x SSC eine Extinktion von genau 0,9 (260 nm) eingestellt. Die DNA-Lösungen wurden bis zur Weiterverarbeitung bei -20°C aufbewahrt.

11.3.2.2 Aufnahme der Renaturierungskinetik

Die Renaturierungskinetiken wurden mit einem Gilford-2600-Spektralphotometer bei 260 nm gegen 2 x SSC aufgenommen. Die aufheizbare Thermoküvette enthielt 4 Kammern. In die erste wurde 2 x SSC, in die 2. und 3. die DNA-Lösungen der beiden Vergleichsstämme und in die 4. eine Mischung beider Lösungen im Verhältnis 1 : 1 einpipettiert. Um die DNA zu denaturieren, wurden die Lösungen in der Küvette 10 Min. auf 100°C erhitzt. Dann wurde rasch auf die Renaturierungstemperatur (nach de Ley, 1970 : $T_{OR} = 0,51 \times \% G+C + 47$) heruntergekühlt, und der Renaturierungsverlauf wurde über 30 Min. durch Messung der Extinktion bei 260 nm verfolgt und aufgezeichnet.

11.3.2.3 Berechnung des Prozentsatzes der Homologie

Aus dem Verlauf der Renaturierungskurven kann der DNA-DNA-Homologiegrad zwischen den beiden Stämmen ermittelt werden. Nach de Ley (1970) gilt folgende Formel:

$$\% \text{ Homologie} = \frac{(4 v_m - v_A - v_B)}{2 \sqrt{v_A \times v_B}} \times 100$$

v_A = Renaturierungsgeschwindigkeit von Stamm A

v_B = Renaturierungsgeschwindigkeit von Stamm B

v_m = Renaturierungsgeschwindigkeit der Mischung

Für die Bestimmung der Reassoziationsgeschwindigkeit wurde nur das mittlere Drittel der Renaturierungskurve (10. - 20. Minute) verwendet, da zu Beginn die optimale Renaturierungstemperatur noch nicht erreicht ist und zum späteren Zeitpunkt die Reassoziationsgeschwindigkeit einer Reaktion 2. Ordnung folgt.

2. DNA-rRNA-HYBRIDISIERUNG

2.1 PRÄPARATION RADIOAKTIV MARKIERTER RNA

Zur Inaktivierung der Nukleasen wurden alle bei der Aufarbeitung verwendeten Geräte und Lösungen sterilisiert (Autoklavieren, Trockensterilisieren bzw. Abreiben mit Alkohol). Außerdem wurden stets Handschuhe getragen. Die Prozedur der 23S rRNA-Präparation ist in Abb. 2 schematisch dargestellt.

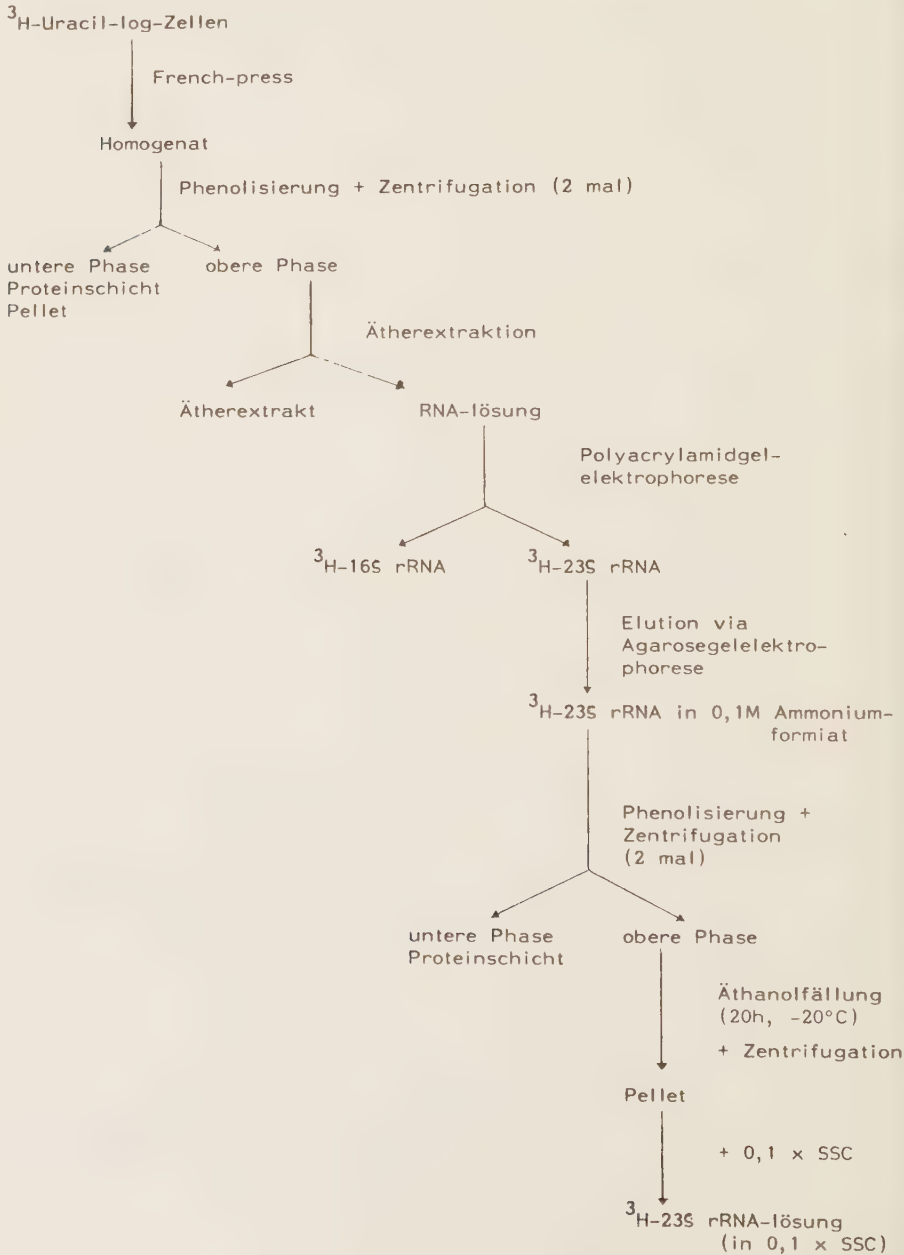
2.1.1 Anzucht und Ernte der Zellen

Zu 300 ml Medium wurden 0,5 - 0,6 mCi (5,6-³H)-Uracil zugegeben, und anschließend wurde es mit 5 - 10 ml einer Übernachtskultur beimpft. Von Zeit zu Zeit wurden Proben entnommen und die optische Dichte im Photometer und die Aufnahme des Uracils im Szintillationszähler gemessen. Die Zellen wurden vor Erreichen der stationären Phase geerntet und nach dem Waschen mit Elektrophoresepuffer tiefgefroren (-20°C).

2.1.2 Herstellung des Polyacrylamidgels

Die Auftrennung der verschiedenen rRNA-Arten erfolgte elektrophoretisch auf einem Polyacrylamidgel (2,8 %) mit einer Fläche von 16,5 x 13,5 cm und einer Dicke von 0,3 cm.

Abb. 2: Schematische Darstellung der einzelnen Schritte der
Präparation von ^3H -23S rRNA



4,2 g Acrylamid und 0,21 g Bisacrylamid wurden in 150 ml Gelpuffer (0,04M Tris, 0,02M Na-acetat, 0,01M EDTA, pH 7,2) gelöst und im Vakuum entgast. Zum Start der Polymerisierung wurden 120 µl TEMED (Serva) und 250 µl Ammoniumperoxodisulfat (50 %) zugegeben, und nach vorsichtigem Durchmischen wurde die Lösung zwischen die vorbereiteten Platten gegossen. Ein Kamm diente zur Aussparung von Geltaschen zum Auftragen der Proben. Nach erfolgter Polymerisation (mind. 2 h bei Raumtemperatur) wurde der Kamm entfernt und die Taschen mit Elektrophoresepuffer (0,04M Tris, 0,02M Na-acetat, 0,001M EDTA, 0,2 % SDS, pH 7,2) gespült. Ein 30-minütiger Vorlauf bei 50 mA wurde gestartet.

12.1.3 Zellaufschluß zur Gewinnung des Rohextrakts

Die gefrorenen Zellen wurden in 1 - 2 ml Elektrophoresepuffer aufgenommen und nach Zusatz von einer Mikrospatelspitze Proteinase K (Merck) (zum Abbau von Nukleasen) und 20 µl einer 25 %igen SDS-Lösung durch einmalige Passage der French-presszelle aufgeschlossen. Der Rohextrakt wurde in eiskaltem wasser-gesättigtem Phenol aufgefangen, ausgeschüttelt und anschließend abzentrifugiert (Sorvallzentrifuge, 8000 - 10000 g). Die obere wässrige Phase wurde ein 2. Mal mit Phenol ausgeschüttelt und nach der anschließenden Ätherextraktion zur Entfernung des in der Lösung noch vorhandenen Phenols wurde der restliche Äther abgeblasen.

12.1.4 Elektrophoretische Auftrennung der ^3H -rRNA-Arten

Der unter 12.1.3 erhaltene Rohextrakt wurde mit 50 µl Glycerin und 10 µl Bromphenolblau (0,8 %) versetzt und auf das Gel aufgetragen. Bis zum Eindringen der blauen Banden in das Gel wurde eine Stromstärke von 35 mA eingestellt, dann wurde sie

auf 50 mA erhöht (ca. 130 V). Nach 12 - 14 h wurde das Gel auf eine mit Fluoreszenzindikator beschichtete Celluloseplatte (Merck) gelegt, und nach Identifizierung der Lage der 16S rRNA- und 23S rRNA-Banden unter UV-Bestrahlung (345 nm) wurde die 23S rRNA-Bande ausgeschnitten.

12.1.5 Elution der RNA durch Agarosegelelektrophorese

Zur Gewinnung der rRNA aus den Polyacrylamidgelstückchen wurden diese einer Agarosegelelektrophorese unterzogen. Elektrophoreseröhrchen ($\varnothing$ 1 cm, Höhe 15 cm) wurden einseitig mit Parafilm verschlossen und etwa zu einem Drittel mit warmer Agaroselösung (0,5 % Agarose in 0,1M Ammoniumformiat) gefüllt. Dann wurden die 23S rRNA enthaltenden Gelstückchen auf das inzwischen erstarrte Agarosegel gegeben und ebenfalls in Agarose (0,5 % in H₂O bidest.) eingebettet. Nach dem Erstarren des Gels wurde mit 0,1M Ammoniumformiatlösung aufgefüllt und das Röhrchen mit Dialyseschlauch verschlossen. Nach 20 Min. Vorlauf bei 5 mA pro Röhrchen wurde die Elektrophorese gestartet. Elektrophoresebedingungen:

Elektrophoresepuffer: 0,1M Ammoniumformiat

Stromstärke: 10 mA pro Elektrophoreseröhrchen

Dauer: 5 - 6 h

Die eluierte RNA sammelt sich im Puffer zwischen Gel und Dialyseschlauch. Um noch am Dialyseschlauch haftende RNA von diesem zu lösen, wurde direkt vor Beendigung der Elektrophorese für ca. 5 Min. umgepolt. Die RNA enthaltende Lösung wurde mit einer sterilen Pasteurpipette entnommen und 2 mal mit wassergesättigtem Phenol ausgeschüttelt. Darauf folgte eine Fällung mit 2 Volumina Äthanol (96 %) und Aufbewahrung über Nacht bei -20°C. Am nächsten Tag wurde die RNA abzentrifugiert (Sorvall-zentrifuge bei 8000 g, 30 Min.) und nochmals mit 2 - 3 Volumina

Äthanol ausgefällt. Nach 2 - 3 h bei -20°C wurde die ausgefällte und abzentrifugierte RNA in $0,1 \times \text{SSC}$ gelöst. Nach Bestimmung der spezifischen Aktivität wurde sie tiefgefroren bei -20°C aufbewahrt.

12.1.6 Bestimmung der spezifischen Aktivität

Die RNA-Menge wurde wie im Falle der DNA photometrisch bestimmt. Bei 260 nm entspricht eine Extinktion von 1,0 40 μg RNA.

12.2 DNA-rRNA-HYBRIDISIERUNG

12.2.1 Durchführung der Hybridisierung

Da RNA nicht unspezifisch an freie Stellen auf dem Nitrocellulosefilter bindet, ist eine Präinkubation der Minifilter mit Denhardt-Reagenz nicht erforderlich. Die Denaturierung erfolgte durch 2-maliges Erhitzen auf 100°C mit sofortiger Abkühlung im Eisbad.

Pro Reaktionsgefäß wurden wegen der niedrigen spezifischen Aktivität 0,4 - 0,6 μg denaturierte RNA in 0,2 ml $2 \times \text{SSC}$, 20 % Formamid eingesetzt. Die Hybridisierung wurde bei 50°C durchgeführt und nach 18 - 20 h im Eisbad abgebrochen.

12.2.2 Nachbehandlung der Filter

Nach dem Absaugen der Reaktionslösung wurden die Minifilter 2 mal mit $2 \times \text{SSC}$ gewaschen. Um die nicht vollständig gepaarten Duplices zu entfernen, wurden die Filter mit je 1 ml

RNase-Lösung (2,5 µg/ml RNase A (Serva), 0,01 U/ml RNase T₁ (Calbiochem Behring)) 45 Min. bei 37°C nachinkubiert. Nach dem Absaugen der RNase-Lösung wurde nochmals für 15 Min. mit 2 x SSC, 20 % Formamid bei 50°C nachinkubiert. Die Filter wurden wiederum 2 mal mit 2 x SSC gewaschen und dann bei 50°C im Vakuum über Nacht getrocknet. Zur Bestimmung der prozentualen Bindung der RNA an die Filter wurde jeweils bei 1 Parallelprobe die gebundene Radioaktivität bestimmt.

12.2.3 Bestimmung der Schmelzpunkte der DNA-rRNA-Hybride (nach de Ley und de Smedt, 1975)

Der Schmelzpunkt $T_{m(e)}$ der DNA-rRNA-Hybride wurde folgendermaßen bestimmt: Die Minifilter wurden in Szintillationsgefäßen mit je 1 ml 1,5 x SSC, 20 % Formamid im Wasserbad in 5°C-Schritten von 50°C auf 90°C erhitzt. 10 Min. nach dem Erreichen der jeweiligen Temperatur wurde das Minifilter in ein neues vorgewärmtes Szintillationsgefäß mit 1 ml 1,5 x SSC, 20 % Formamid überführt und die vom Filter abgelöste Radioaktivität im Szintillationszähler gemessen.

Der Schmelzpunkt $T_{m(e)}$ ist als die Temperatur definiert, bei der sich 50 % der RNA vom Filter gelöst hat und wurde durch Auftragen der % abgelösten RNA gegen die Temperatur graphisch ermittelt.

13. 16S rRNA-PARTIALSEQUENZIERUNG

13.1 ISOLIERUNG UND REINIGUNG DER 16S rRNA

Die Methoden der 16S rRNA-Präparation entsprechen denen der 23S rRNA (siehe 12.1)

13.2 RNase T₁-VERDAUUNG UND IN VITRO-MARKIERUNG DER 16S rRNA

13.2.1 Spaltung der 16S rRNA mit RNase T₁

Die 40 µg RNA entsprechende Menge wurde mit H₂O bidest. auf 80 µl gebracht, und 5 µl Tris-puffer (1M Tris-HCl, pH 8,0) und 2,5 µl RNase T₁ (1000 U/ml, Calbiochem-Behring) wurden zugegeben. Nach 3-stündiger Inkubation bei 37°C im Wasserbad wurde die Reaktion durch 2-minütiges Erhitzen auf 100°C abgebrochen und die Lösung anschließend bei -20°C eingefroren.

13.2.2 In Vitro-Markierung der 16S rRNA

Zu 1mCi γ -³²P-ATP (NEN, 1000 - 3000 Ci/mmol) in 10 µl H₂O bidest. wurden 5 µl der T₁-verdauten RNA-Lösung, 1 µl Tris-puffer (1M, pH 8,0), 1 µl unmarkiertes ATP (50 mM), 3 µl eines Gemisches aus MgCl₂ (0,2 M), Spermidin (0,017 M) und Mercaptoäthanol (0,3 M) und 1,2 µl phosphatasefreier T₄-Polynucleotidkinase (NEN, 8000 U/ml) zugegeben. Nach 30-minütiger Inkubation bei 37°C wurde die Reaktion durch 2-minütiges Erhitzen auf 100°C abgebrochen. Die in der Vakuumzentrifuge getrocknete Probe wurde mit 2,4 µl H₂O bidest. versetzt.

13.3 BESTIMMUNG DER SEQUENZ DER T₁-RESISTENTEN 16S rRNA-OLIGONUKLEOTIDE

Die Methoden sind im Einzelnen bei Stackebrandt et al. (1985) beschrieben. Es folgt hier daher nur eine kurze Zusammenfassung der einzelnen Schritte.

13.3.1 Trennung der Oligonukleotide

Die Trennung der 5'-markierten T_1 -resistenten Oligonukleotide erfolgte durch die Kombination einer Hochspannungselektrophorese (1. Dimension) und einer Dünnschichtchromatographie (2. Dimension). Durch Autoradiographie erhält man einen "Fingerprint" der aufgetrennten Oligonukleotide.

13.3.2 Isolierung und Spaltung der einzelnen Oligonukleotide

13.3.2.1 Isolierung

Die Flecken, die RNA-Stücke aus 6 oder mehr Nukleotiden enthalten, wurden mit Alkohol befeuchtet und ausgekratzt. Durch 3-malige Zugabe von je 100 μ l 1M NaCl und Zentrifugation in ausgezogenen, am unteren Ende mit Watte verstopften Glasröhrchen wurden die Oligonukleotide aus der DEAE-Cellulose eluiert und anschließend durch Zugabe von 700 μ l Äthanol gefällt (-20°C).

13.3.2.2 Alkali-spaltung

Die frühestens nach 2h abzentrifugierte RNA wurde in der Vakuumzentrifuge getrocknet und dann mit 10 μ l 50 mM NaHCO_3 (pH 9,2) 21-23 Min. bei 100°C inkubiert. Danach wurden 1,2 μ l 2N HCl zugegeben, und die Proben wurden wieder im Vakuum getrocknet.

13.3.3 Sequenzierung der Oligonukleotide (Sekundäranalyse)

Zur Sequenzbestimmung der einzelnen Oligonukleotide wurden diese nach der Alkalispaltung wiederum einer Kombination aus

Hochspannungselektrophorese und Dünnschichtchromatographie unterworfen. Durch Autoradiographie wurde die Lage der einzelnen 5'-markierten Fragmente sichtbar gemacht. Die Sequenzierung erfolgte mit Hilfe der "mobility shift"-Methode (siehe Stackebrandt et al., 1985).

3.3.4 Tertiäre Analyse

In vielen Fällen waren zur eindeutigen Sequenzbestimmung zusätzliche Bestimmungsverfahren notwendig.

3.3.4.1 Endgruppenbestimmung

Der betreffende Fleck, der das Oligonukleotid enthält, dessen Endgruppe bestimmt werden sollte, wurde ausgekratzt und die RNA auf die schon beschriebene Weise isoliert. Das gefällte und getrocknete Material wurde mit 4 µl P₁-Nuklease (25 ng/ml in 0,05 M NH₄-acetat, pH 4,5) durch 20-stündige Inkubation bei 37°C vollständig verdaut. Die 5'-markierten Nukleotide konnten durch eindimensionale Chromatographie auf Cellulosedünnschichtplatten in tertiärem Butanol:H₂O:konz. HCl = 14:3:3 identifiziert werden.

3.3.4.2. Eindimensionale Dünnschichtchromatographie (zur Unterscheidung von Purinen und Pyrimidinen)

Das Alkalihydrolysat wurde in 100 µl H₂O aufgenommen, und durch Zugabe von 300 µl Äthanol wurde die RNA gefällt. Nach 20 h bei -20°C wurde die RNA abzentrifugiert, getrocknet und in 2,2 µl H₂O bidest. aufgenommen. Die Trennung erfolgte durch eindimensionale Homochromatographie auf einer DEAE-Cellulosedünnschichtplatte in einem Gemisch aus "Homomix" (gleiche Volumina von 20, 30, 50 und 75 mM KOH-Homomix) bei 70°C.

13.3.4.3 Homochromatographie zur besseren Auftrennung von sehr langen Fragmenten

Der Ammoniumformatgradient in der 2. Dimension wurde durch "Homomix" (10:20:30:50:75 mM KOH = 0,5:1:1:1:1) ersetzt (Herstellung des "Homomix" durch Hydrolyse einer 3 %igen Hefe-RNA-Lösung in 7M Harnstoff durch KOH (10, 20, 20, 50, 75mM) bei 65°C für 20 h, pH-Einstellung mit Eisessig auf 4,7).

13.4 BESTIMMUNG DES ÄHNLICHKEITSKOEFFIZIENTEN (S_{AB} -Wert) (nach Fox et al., 1977)

Die ermittelten Sequenzen der T_1 -resistenten Oligonukleotide wurden mit den Katalogen aus schon bekannten Oligonukleotidsequenzen anderer Arten verglichen und der S_{AB} -Wert nach folgender Formel berechnet:

$$S_{AB} = \frac{2 N_{AB}}{N_A + N_B}$$

N_A = Gesamtzahl der Nukleotide der sequenzierten Oligomere in Organismus A

N_B = Gesamtzahl der Nukleotide der sequenzierten Oligomere in Organismus B

N_{AB} = Anzahl der Nukleotide der Oligomeren, die in beiden Organismen A und B vorkommen.

Es werden nur Oligonukleotide mit einer Kettenlänge > 5 (d. h. ab Hexamere) berücksichtigt.

II.

ERGEBNISSE

VORVERSUCHE ZUR VERBESSERUNG DES WACHSTUMS UND DER LYSER DER ZELLEN

1.

WACHSTUM DER ORGANISMEN AUF VERSCHIEDENEN MEDIEN

Die meisten *Lactobacillus*-, *Pediococcus*- und *Leuconostoc*-Stämme ließen sich auf MRS-Medium (de Man et al., 1960), pH 6,5 bei 34°C gut kultivieren. *L.malefermentans* und *Ped.damnosus* bevorzugten ein leicht saures Milieu (pH 5,4) und eine etwas niedrigere Bebrütungstemperatur (27°C), und bei einigen Stämmen (Bierisolate) ließ sich das Wachstum durch Zugabe von Cenovis-Hefeextrakt anstelle des sonst verwendeten Oxoid-Hefeextraktes deutlich verbessern. *L.kandleri* zeigte in einem Gemisch aus MRS und APT-Medium (Difco) im Verhältnis 1:1 bei pH 7,0 besseres Wachstum als in reinem MRS-Medium.

Eine Reihe von Stämmen wuchs jedoch nicht oder nur sehr schlecht auf normalem oder modifiziertem MRS. Für diese mußten Spezialmedien verwendet werden. So konnte z. B. *L.trichodes* 1985 nur in einem Medium nach Kunkee (Garvie et al., 1974), das neben Tomatensaft auch Äthanol enthält und dessen pH auf 5,5 eingestellt wurde, zum Wachstum gebracht werden, nicht aber in MRS- oder APT-Medium (Difco) mit Äthanolzusatz und pH 5,2 und auch nicht in *L.heterohiochii*-Medium. *Lc. oenos*, *L.sanfrancisco* und *L.heterohiochii* wurden auf ihrem jeweiligen Spezialmedium angezogen. Zum Beispiel war für das Wachstum von *L.heterohiochii*-Stämmen Mevalonsäure essentiell und mußte daher dem betreffenden Medium zugesetzt werden.

Die Streptokokken wurden auf Bacto-Medium, *Enterococcus faecalis* auf HD-Medium kultiviert.

L.collinoides 27612 wurde zunächst auf Tomatensaftmedium angezogen. Da der Stamm in diesem Medium aber nur langsam wuchs und keine hohen Zelldichten erreichte, wurde das Wachstum auf verschiedenen abgewandelten Medien bei 2 verschiedenen pH-Werten (pH 5,3 und pH 6,3) getestet.

Der Verlauf des Wachstums bei pH 5,3 ist in Abbildung 3 graphisch dargestellt. Da bei pH 6,3 fast die gleichen Werte gemessen wurden, wurde auf eine Darstellung der Wachstumskurven bei diesem pH-Wert verzichtet. Eine deutliche Abhängigkeit des Wachstums von der Zugabe von Maltose bzw. Tomatensaft ist festzustellen. Das beste Wachstum erfolgte in MRS mit Maltose statt Glucose. (Abb. 3).

1.2

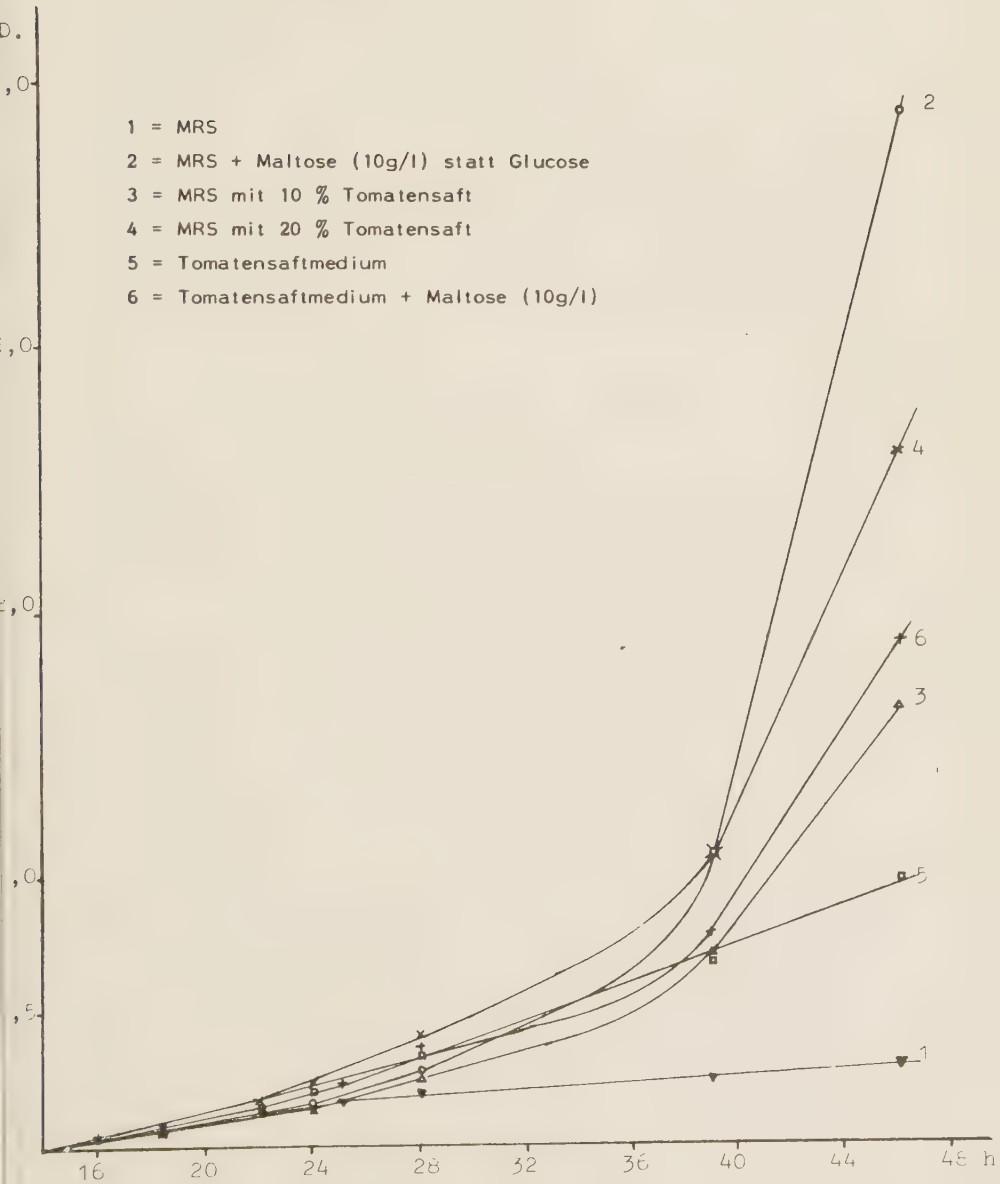
VERSUCHE ZUR VERBESSERUNG DER LYSE DER ZELLEN

Für die DNA-DNA-Hybridisierungen nach der Filtermethode wird hochmolekulare DNA benötigt. Ein schonendes Zellaufschlußverfahren ist daher notwendig. Normalerweise werden in der logarithmischen Phase geerntete Zellen mit Lysozym bei 37°C inkubiert. Bei einer Reihe von Betabakterien ergab sich mit Lysozym aber nur eine sehr schlechte Lyse der Zellen. Garvie (1976) und Rogosa (1970) berichten von ähnlichen Schwierigkeiten. Deshalb wurden verschiedene Verfahren zur Verbesserung der Lyse ausprobiert.

Getestet wurde die Lysozymempfindlichkeit jeweils auf zweierlei Weise:

- 1) mikroskopisch (Phasenkontrastmikroskop)
- 2) durch Zugabe von 50 µl 25 %iger SDS-Lösung zu 0,5 ml Zellsuspension und kurzes Erhitzen auf 60°C. Bei erfolgter Lyse entsteht eine hochviskose schleimige Suspension.

Abb. 3: Wachstum von *L. collinoides* (ATCC 27612) auf verschiedenen Medien



1.2.1 Zugabe von Penicillin während der Anzucht

Es wurden folgende Stämme getestet: Kefirsolate 20587 und E 40, *L.buchneri* 20057, *L.frigidus* 20173 und *L.collinoides* 27612. Das Penicillin wurde in den Endkonzentrationen 1 Unit/ml, 10 Units/ml, 100 Units/ml und 1000 Units/ml eingesetzt. Die Zugabe erfolgte steril bei einer O.D.₅₇₈ von 0,4 - 0,5, und die Zellen wurden bei einer O.D.₅₇₈ von 0,8 - 1,0 - sofern diese erreicht wurde - geerntet und zum Teil bis zu 22 h mit Lysozym inkubiert. Nur im Falle von *L.frigidus* 20173 konnte eine deutliche Verbesserung der Lyse beobachtet werden, nicht aber bei den übrigen getesteten Stämmen.

1.2.2 Zugabe von Glycin während der Anzucht

Glycin kann anstelle von L-Alanin in die Peptiduntereinheit des Mureins eingebaut werden, was zu einer geringeren Quervernetzung und damit zu einer größeren Lysozymempfindlichkeit führt (Hammes et al., 1973).

Die ersten Vorversuche zeigten, daß hohe Glycinkonzentrationen (1 - 6 %) benötigt werden, um eine deutliche Verbesserung der Lyse der Zellen bei der Lysozymbehandlung zu erzielen. Um bei den 15l-Massenkulturen weniger große Glycinmengen einsetzen zu müssen, wurden die Zellen vor der Glycinzugabe abzentrifugiert und in einer geringeren Menge an MRS-Medium (ein Fünftel des ursprünglichen Volumens) wiederaufgenommen. Diese Konzentrierung der Zellsuspension mit anschließender Zugabe von Glycin in den Konzentrationen 1 %, 3 % und 6 % erfolgte zu verschiedenen Wachstumsphasen (frühe logarithmische, späte logarithmische und stationäre Phase). Die Zellen wurden nach unterschiedlich langer Inkubation mit Glycin (in der Regel 3 - 6 h, in einigen Fällen 20 h) geerntet und nach dem Waschen mit Saline-EDTA-Puffer bei -20°C eingefroren. Am nächsten Tag wurden sie verschieden

lange mit Lysozym inkubiert. Getestet wurden folgende Stämme: Kefirisolate 20587 und E 40, *L.pastorianus* 20197, *L.buchneri* 20057, *L.reuteri* 20016, *L.hilgardii* 20176, *L.malefermentans* 11306 und *L.collinoides* 27612.

Die Erfolge des Glycineinsatzes zur Verbesserung der Lyse waren je nach verwendetem Stamm sehr unterschiedlich. Bei einigen (*L.pastorianus* 20197 (siehe Tab. 3), *L.reuteri* 20016, *L.buchneri* 20057 und *L.hilgardii* 20176) wurde eine deutliche Verbesserung der Lyse erreicht, bei den anderen war diese Methode nur mäßig (*L.kefir* E 40 und *L.collinoides* 27612) oder gar nicht erfolgreich (*L.kefir* 20587 und *L.malefermentans* 11306).

Allgemein läßt sich feststellen: Wurde Glycin erst nach Erreichen der stationären Phase (siehe Tab. 4) eingesetzt, lysierten die Zellen deutlich schlechter als bei einer Zugabe während der logarithmischen Phase. Eine möglichst frühzeitige Glycinzugabe ist also anzustreben. Außerdem begünstigte in der Regel eine Erhöhung der Glycinkonzentration die Lyse mit Lysozym. Eine Verlängerung der Inkubationszeit mit Lysozym führte bei *L.pastorianus* (Tab. 3) zu einer Verbesserung der Lyse, bei anderen wie z. B. *L.buchneri* dagegen nicht.

1.2.3 Einsatz von "lysing enzymes" (Sigma) anstelle von Lysozym

Der Einsatz von "lysing enzymes" (Sigma) wurde nur an 2 Stämmen erprobt. Von *L.hilgardii* 20176 wurden in der logarithmischen Phase, von *L.collinoides* 27612 stationär geerntete Zellen verwendet. In beiden Fällen lysierten auch bei einer 24 h Inkubation mit "lysing enzymes" fast keine Zellen.

	Inkubationszeiten mit Lysozym					
	3h		5h		24h	
Glycin-Konzentration	Glycinzugabe bei O.D.					
	0,5	0,9	0,5	0,9	0,5	0,9
0 %	-	-	-	-	+	+
1 %	-	-	(+)	-	++	+
3 %	-	-	+	(+)	++	++
6 %	(+)	-	++	+	++	+

Tab. 3: Abhängigkeit des Erfolges der Lyse mit Lysozym vom Zeitpunkt des Einsatzes von Glycin, der Glycinkonzentration und von den Inkubationszeiten mit Lysozym bei *L.pastorianus* 20197

- = keine Lyse

(+) = sehr schwache Lyse (< 10 %)

+

++ = starke Lyse (> 50 %)

Glycin-konzentration	Glycinzugabe bei O.D.		
	0,5	0,8	1,8
0 %	-	-	-
1 %	(+)	-	-
3 %	+	(+)	-

Tab 4: Abhängigkeit des Erfolges der Lyse (nach 3 h) vom Zeitpunkt des Einsatzes und der Konzentration des Glycins bei *L.kefir* E 40.

- = keine Lyse

(+) = sehr schwache Lyse (< 10 %)

+

.2.4 Einsatz von Mutanolysin zusätzlich zu Lysozym

Mutanolysin ist eine u. a. zur Gewinnung von Protoplasten von Streptokokken (Siegel et al., 1981) verwendete Muramidase (Yokogawa et al., 1975).

Zellen von *L.hilgardii* 20176, die nur unter Glycinzugabe durch Lysozym angreifbar waren, sowie von *L.collinoides* 27612, *L.malefermentans* 11306 und *L.kefir* 20587, bei denen alle zuvor erprobten Methoden zu keinem genügenden Erfolg geführt hatten, wurden mit einem Gemisch von Lysozym und Mutanolysin (Sigma) (ca. 1mg/l) bei 37°C inkubiert. Es konnte nicht nur im Falle von *L.hilgardii* 20176, sondern auch bei *L.collinoides* 27612, *L.malefermentans* 11306 und *L.kefir* 20587 nach einer relativ langen Inkubationszeit von ca. 20 h eine deutliche Verbesserung der Lyse beobachtet werden. Bemerkenswerterweise lysierten auch Zellen, die erst bei einer O.D.₅₇₈ von 1,8 geerntet worden waren. Von *L.kefir* 20587 wurden Zellen eingesetzt, die während des Wachstums bereits mit 5 % Glycin inkubiert worden waren, aber mit Lysozym allein nicht zur Lyse gebracht werden konnten.

Tabelle 5 gibt eine Übersicht über die bei den verschiedenen Stämmen angewendeten Methoden zur Verbesserung der Lyse.

Stamm	angewendete Methoden :			
	Penicillin	Glycin	"lysing enzymes"	Mutanolysin
<i>L. frigidus</i> 20173	+	0	0	0
<i>L. buchneri</i> 20057	-	+	0	0
<i>L. kefir</i> 20587	-	-	0	+
<i>L. kefir</i> E 40	-	(+)	0	0
<i>L. pastorianus</i> 20197	0	+	0	0
<i>L. collinoides</i> 27612	-	(+)	-	+
<i>L. malefermentans</i> 11306	0	-	0	+
<i>L. hilgardii</i> 20176	0	+	-	+
<i>L. reuteri</i> 20016	0	+	0	0

Tab. 5: Übersicht über die bei den verschiedenen Stämmen angewendeten Methoden zur Verbesserung der Lyse und deren Erfolg.

Penicillin: Penicillinzugabe zu wachsenden Zellen und anschließende Lysozymbehandlung

Glycin: Glycinzugabe zu den wachsenden Zellen und anschließende Lysozymbehandlung

"lysing enzymes": Verwendung von "lysing enzymes" anstelle von Lysozym

Mutanolysin: Verwendung von Mutanolysin zusätzlich zu Lysozym

+ = Verbesserung der Lyse

- = keine Verbesserung der Lyse

0 = nicht geprüft

TAXONOMISCHE UNTERSUCHUNGEN AN HETEROFERMENTATIVEN LAKTOBAZILLEN (BETABAKTERIEN) UND LEUCONOSTOC-ARTEN

VERWANDTSCHAFTSBEZIEHUNGEN INNERHALB DER BETABAKTERIEN,
DIE DEN LYS-ASP-MUREINTYP BESITZEN

Zu Beginn der Arbeit waren folgende Betabakterienarten mit Murein des Lys-Asp-Typs gültig beschrieben, d. h. in die "approved lists of bacterial names" (Skerman et al., 1980) aufgenommen: *L.brevis*, *L.buchneri*, *L.collinoides*, *L.heterohiochii*, *L.fructivorans*, *L.trichodes*, *L.hilgardii* und *L.reuteri*.

Die in der 8. Ausgabe von Bergey's Manual (Buchanan und Gibbons, 1974) als "species incertae sedis" bezeichneten Arten umfassten: *L.bifermentans*, *L.malefermentans*, *L.parvus*, *L.frigidus* und *L.pastorianus*.

1.1

Physiologische und biochemische Merkmale

Von den Typstämmen der oben erwähnten Arten sowie 3 Kefirisolaten (Stämme 20485, 20587 und E 40) und 2 weiteren Stämmen von *L.reuteri* (20056 und 20059) wurde zunächst eine Anzahl verschiedener physiologischer und biochemischer Merkmale bestimmt bzw. überprüft (Tab. 6).

Es ergab sich eine gute Übereinstimmung mit den in Bergey's Manual (Buchanan und Gibbons, 1974) beschriebenen Merkmalen. Bei *L.trichodes* 1985 wurde die bis dahin noch nicht bekannte Mureinstruktur aufgeklärt. Es liegt auch hier der Lys-Asp-Typ vor.

Aufgrund der verschiedenen physiologischen und biochemischen Merkmale ist eine Unterscheidung zwischen der Mehrzahl der Betabakterien, die den Lys-Asp-Mureintyp besitzen möglich.

Tab. 6: Physiologische und biochemische Eigenschaften der Betabakterien mit Lys-Asp-Mureintyp

Species	Stamm	Spektrum an vergärbaren Zuckern und Argininspaltung																	Elektropho- retische Beweglichkeit der *	G+C-Gehalt (mol%)	
		Ribose	Arabinose	Xylose	Sorbit	Mannit	Raffinose	Melibiose	Melezitose	Rhamnose	Saccharose	Maltose	Trehalose	Lactose	Cellulose	Salicin	Gluconat(Gas)	Arginin			Zellwand: Teichonsäuren
<i>L.brevis</i>	20054	+	+	+	-	-	-	(+)	-	-	-	+	-	-	-	-	+	+	D-LDH 1,64	L-LDH 1,4	45,3
<i>L.kefir</i>	20485	+	+	-	-	-	-	+	-	-	-	+	-	+	-	-	+	+	1,12	0,98	41,9
<i>L.kefir</i>	20587	+	+	-	-	-	-	+	-	-	-	+	-	+	-	-	+	+	1,17	0,99	41,1
<i>L.Kefir</i>	E 40	+	+	-	-	-	-	+	-	-	-	+	-	+	-	-	+	+	1,17	1,0	41,0
<i>L.buchneri</i>	20057	+	+	+	-	-	-	+	+	-	+	+	-	-	-	-	+	+	1,33	1,22	44,7
<i>L.frigidus</i>	20173	+	+	-	-	-	-	+	+	-	+	+	-	-	-	-	+	+	1,36	1,3	44,6
<i>L.pastorianus</i>	20197	+	-	-	-	-	-	+	-	-	-	+	(+)	-	-	-	+	+	1,56	1,33	49,3
<i>L.collinoides</i>	27612	+	+	-	-	-	-	+	-	-	-	+	(+)	-	-	-	+	+	1,50	1,22	45,6
<i>L.heterohiochii</i>	20350	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	0	-	-	39,1
<i>L.fructivorans</i>	20203	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	+	+	-	-	39,3
<i>L.trichodes</i>	1985	+	-	-	-	-	-	-	0	-	(+)	+	-	-	-	-	0	0	-	-	39,0
<i>L.parvus</i>	20177	+	(+)	+	-	-	-	+	-	-	-	+	-	-	-	-	+	+	1,61	1,4	44,9
<i>L.malefermentans</i>	11306	+	-	-	-	-	-	-	0	-	-	+	-	-	-	0	0	0	1,5	1,32	39,3
<i>L.hilgardii</i>	20176	+	-	+	-	-	-	+	-	-	-	+	-	+	-	-	+	+	1,31	0,97	40,3
<i>L.reuteri</i>	20016	+	+	-	-	-	-	+	+	-	+	+	-	+	-	-	+	+	1,86	0,91	40,3
<i>L.reuteri</i>	20056	+	-	-	-	-	-	+	-	-	+	+	-	+	-	-	+	+	1,87	0,83	38,6
<i>L.reuteri</i>	20059	+	+	+	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+	2,05	0,78	42,4
<i>L.bifermentans</i>	20003	+	-	-	+	+	-	-	-	+	-	+	-	-	-	-	0	0	1,17	1,26	44,9

* Laufstrecken sind bezogen auf Kaninchen-L-LDH iso I (= 1,0) 0 = nicht getestet

.1.1.1 G+C-Gehalt

Der G+C-Gehalt der DNA trägt nur wenig zur Differenzierung zwischen den verschiedenen Arten bei, da sich die meisten Arten nur geringfügig in diesem Merkmal unterscheiden. Lediglich *L.pastorianus* kann aufgrund seines relativ hohen G+C-Gehalts von rund 50 mol% leicht von den übrigen Arten abgetrennt werden, deren G+C-Gehalt entweder zwischen 39 und 42 mol% oder zwischen 44 und 45 mol% liegt.

.1.1.2 Elektrophoretische Beweglichkeit der LDHs

Die Elektrophorese der LDHs der verschiedenen Stämme ergab nur zum Teil deutlich unterschiedliche Laufstrecken im Polyacrylamidgel. Eine jeweils identische elektrophoretische Beweglichkeit zeigten die LDHs von *L.brevis* und *L.parvus*, von *L.buchneri* und *L.frigidus*, von *L.malefermentans* und *L.pastorianus* und die LDHs der 3 Kefirisolate. Auch der Typstamm von *L.reuteri* (20016) und Stamm 20056 unterschieden sich kaum in der Mobilität ihrer beiden LDHs. Eine Unterscheidung dieser Paare ist daher aufgrund der elektrophoretischen Beweglichkeit der LDHs nicht möglich. Bei den Typstämmen von *L.heterohiochii*, *L.fructivorans* und *L.trichodes* konnte keine LDH-Aktivität im Gel beobachtet werden.

.1.1.3 Zuckervergärungsspektren

In den Zuckervergärungsspektren unterscheiden sich die verschiedenen Arten nur wenig. Auffällig ist die Übereinstimmung in vielen negativen Merkmalen: Cellobiose, Trehalose, Mannit, Sorbit und Rhamnose konnten mit Ausnahme von *L.bifermentans* von keinem der Stämme vergoren werden. Die Unterschiede in den Spektren beschränken sich in den meisten Fällen auf 1 - 3 Zucker. *L.brevis* 20054 und *L.parvus* 20177 stimmen in ihrem

Zuckerspektrum überein, ebenso die 3 Kefirisolate; sehr viele (z. B. die Paare *L.frigidus* und *L.buchneri*, *L.kefir* und *L.pastorianus*, sowie *L.malefermentans* und *L.heterohiochii* bzw. *L.fructivorans*) unterscheiden sich nur in einem Merkmal.

Erfahrungsgemäß sind so geringfügige Unterschiede im Zuckervergärungsspektrum bei der Untersuchung einer größeren Anzahl von Stämmen für deren eindeutige Identifizierung nicht ausreichend.

2.1.2 DNA-DNA-Hybridisierungen

Die DNA-DNA-Homologiestudien sollten klären, ob die bisher untersuchten Stämme mit Murein vom Lys-Asp-Typ mit Recht zu verschiedenen Arten gestellt wurden, und ob sich Vertreter der "species incertae sedis" in bereits gültig beschriebene Arten einordnen lassen. Es wurde die DNA-DNA-Renaturierungsmethode nach de Ley (1970) angewendet.

2.1.2.1 Zur Bewertung der Renaturierungsmethode

Die Renaturierungsmethode weist einige arbeitstechnische Vorteile gegenüber der Filtermethode auf. Da weder hochmolekulare noch radioaktive DNA notwendig sind und sich damit keine Probleme mit dem Zellaufschluß ergeben, erfordert sie weniger Arbeitszeit und ist billiger. Außerdem können leicht alle Stämme untereinander verglichen werden, während man bei der Filtermethode die Stämme immer nur mit dem markierten Referenzstamm hybridisieren kann. Auf der anderen Seite hat die Renaturierungsmethode aber den Nachteil, daß bei ihr der "Background" ungleich höher ist, d. h. selbst für weit entfernte Arten werden Homologiewerte um 30 % gefunden (Huss et al., 1983). Dies bestätigten eigene Kontrollversuche (Tab. 7), bei denen mit der DNA von Stämmen, die bereits nach der Filtermethode hybridisiert worden waren

und sehr niedrige Homologien ergeben hatten, auch Hybridisierungen nach der Renaturierungsmethode durchgeführt wurden. Ein Vergleich der Homologiedaten beider Methoden zeigt, daß man bei der Renaturierungsmethode deutlich höhere Werte erhält. Während sie bei der Filtermethode mit einer Ausnahme unter 10 % lagen, ergaben sich hier Werte zwischen 11 und 32 %.

Weiterhin wird deutlich, daß es sich nicht um eine additive oder proportionale Verschiebung der Homologiewerte handelt, sondern daß keinerlei Gesetzmäßigkeit der Abweichung auftritt. So entspricht der niedrigste mit Hilfe der Filtermethode ermittelte Wert (3 %) dem höchsten Wert (32 %) der Renaturierungsmethode. Alle Daten zwischen 0 und ca. 35 % fallen offenbar in den Unschärfbereich der Renaturierungsmethode. Im oberen Bereich ergibt sich dagegen eine sehr gute Korrelation zwischen den Ergebnissen beider Hybridisierungstechniken (vergleiche Tab. 10 und 11).

Daher wurden im Folgenden nur Stämme miteinander hybridisiert, die aufgrund von einem ähnlichen G+C-Gehalt einen relativ hohen Verwandtschaftsgrad erwarten ließen.

miteinander hybridisierte Stammpaare			Filtermethode	Renaturierungsmethode
L.agilis 262	+	L.sharpeae 104	5 %	15 %
L.ruminis 20403	+	L.sharpeae 104	6 %	11 %
L.agilis 262	+	L.ruminis 20403	12 %	29 %
L.agilis 262	+	L.maltaromicus 20342	3 %	32 %
L.ruminis 20403	+	L.maltaromicus 20342	4 %	27 %

Tab. 7: Vergleich einiger Homologiedaten der beiden verschiedenen DNA-DNA-Hybridisierungsverfahren.

2.1.2.2 Hybridisierungsergebnisse

Die Hybridisierungsergebnisse sind in Tab. 8 dargestellt.

Die Hybridisierung der DNA von *L.brevis* 20054 und *L.parvus* 20177 ergab eine sehr hohe Homologie (88 %), d. h. *L.parvus* scheint keine eigene Art, sondern ein Vertreter von *L.brevis* zu sein. Dieser Befund entspricht auch der aus Tab. 6 ersichtlichen völligen Identität der phenetischen Eigenschaften, steht aber im Widerspruch zu den Ergebnissen der DNA-DNA-Hybridisierungen von Vescovo et al. (1979), die eine sehr hohe Homologie zwischen *L.parvus* und *L.malefermentans* fanden. Eine Identität dieser beiden Stämme ist aber auch aufgrund der unterschiedlichen physiologischen Merkmale (G+C-Gehalt, Zuckervergärungsspektrum, Laufstrecken der LDHs bei der Gelelektrophorese) sehr unwahrscheinlich (Tab. 6). Eine denkbare Erklärung für die Diskrepanz der Hybridisierungsergebnisse könnte darin liegen, daß Vescovo et al. (1979) ihren *L.parvus*-Stamm von der ATCC bezogen haben, wir aber Stamm DSM 20177, eine Subkultur des ATCC-Stamms 11305 verwendet haben, die durch eine Verwechslung möglicherweise mit der Ursprungskultur nicht mehr identisch ist. Es bleibt daher die Identität der beiden Stämme zu prüfen.

Die Typstämme von *L.fructivorans*, *L.heterohiochii* und *L.trichodes*, die sich durch ihre hohe Alkohol- (13 - 15 %) und Säuretoleranz, ihr sehr eng begrenztes Zuckervergärungsspektrum und ihr langsames Wachstum auszeichnen, erwiesen sich als untereinander hoch-homolog.

Die Stämme dieser 3 Arten stimmen auch in den untersuchten Merkmalen gut überein (Tab. 6). Sie weisen die gleiche Morphologie (sehr schlanke, lange Stäbchen), das annähernd gleiche Spektrum an vergärbaren Zuckern und denselben G+C-Gehalt (39 %) auf. Zum Wachstum bevorzugen sie einen leicht sauren pH-Wert (ca. 5,0) und eine Temperatur von 25 - 30°C.

% auf DNA-Analysen (ermittelt mit Hilfe der Filtermethode)

Stamm	20054	20177	20485	20587	E 40	20057	20197	20173	27612	20350	20203	1985	11306	20176	20016	20056
<i>L. brevis</i> *																
20054	/	88	16			20	30	23	19	29	34		31	29		37
<i>L. parvus</i>																
20177	88	/		28					31				35			
<i>L. kefir</i>																
20485	16		/	74	85		48	30		29						
<i>L. kefir</i> *																
20587		28	74	/	83		41	25	37	36		26	48	42	28	28
<i>L. kefir</i>																
E 40			85	83	/	42										
<i>L. buchneri</i> *																
20057	20		48	41	42	/	29	28	20	32	31		39	33	26	25
<i>L. pastorianus</i>																
20197	30		30	25		29	/	19	44	31	40			34		33
<i>L. frigidus</i>																
20173	23			37		28	19	/	26	20	22		36	26	19	42
<i>L. collinoides</i> *																
27612	19	31		36		20	44	24	/	31	28		32	25		23
<i>L. heterohiochii</i> *																
20350	29		29			32	31	20	31	/	99	99	34	29		
<i>L. heterohiochii</i>																
20353										103	80	85				
<i>L. fructivorans</i> *																
20203	34			26						99	/	84	24	27		16
<i>L. trichodes</i> *																
1985										99	84	/				
<i>L. malefermentans</i>																
11306	31	35		48		39		36	32	34	24		/	36	34	36
<i>L. hilgardii</i> *																
20176	29			42		33	34	26	25	29	27		36	/		18
<i>L. reuteri</i> *																
20016				26		26		19					34		/	63
<i>L. reuteri</i>																
20056	37			28		25	33	42	23		16		36	18	63	/
<i>L. reuteri</i>																
20059				30				34					43		40	35
<i>L. bif fermentans</i> *																
20003	13		18			8	21	16	27	16	22		29	20	20	34

Typstämme sind mit * versehen

Ihre Zellwand enthält im Gegensatz zu den meisten übrigen Betabakterien keine Teichonsäuren. Allgemein wachsen die Vertreter dieser 3 Arten nicht auf gewöhnlichen Laktobazillennährböden, sondern benötigen Spezialmedien. *L.fructivorans* 20203 kann zwar nach längerer Laborkultur auf normalem MRS angezogen werden, aber bei der 1. Isolierung lassen sich auch *L.fructivorans*-Stämme kaum auf MRS-Medium kultivieren (Dakin und Radwell, 1971). Das Mevalonsäurebedürfnis von *L.heterohiochii* läßt sich als spezielle Anpassung an das Biotop, in dem diese Organismen gewöhnlich vorkommen, erklären.

Die nahe Verwandtschaft von *L.fructivorans* und *L.trichodes* war schon von Dakin und Radwell (1971) vermutet worden, und Vescovo et al. (1979) kamen aufgrund ihrer DNA-DNA-Homologiestudien zu demselben Ergebnis. Allerdings fanden Vescovo et al. keine hohe Homologie von *L.fructivorans* und *L.trichodes* zu *L.heterohiochii*, sondern zwischen *L.heterohiochii* und *L.buchneri*. Um die Richtigkeit des hohen Homologiewertes des Typstamms von *L.heterohiochii* (20350) gegenüber *L.trichodes* und *L.fructivorans* zu überprüfen, wurde noch ein 2. Stamm von *L.heterohiochii* (20353) in die Hybridisierungen mit *L.trichodes* und *L.fructivorans* bezogen. Es zeigte sich klar, daß beide Stämme von *L.heterohiochii* sowohl mit *L.fructivorans* als auch mit *L.trichodes* hoch-homolog sind.

Das davon abweichende Ergebnis von Vescovo et al. (1979) läßt sich mit der Annahme erklären, daß es sich bei der Kultur der Autoren nicht um den Typstamm von *L.heterohiochii*, sondern um einen *L.buchneri*-Stamm gehandelt hat. Dafür spricht auch, daß der von Vescovo et al. (1979) verwendete Stamm in mit Mevalonsäure ergänztem MRS-Medium wuchs, während dies bei unserem Stamm nicht der Fall war. Die *L.heterohiochii*-Stämme 20350 und 20353 konnten nämlich, wie schon erwähnt, nur in einem speziellen mevalonsäurehaltigen Medium, dem außerdem Äthanol zugesetzt war, zum Wachstum gebracht werden.

Aufgrund der sehr hohen DNA-DNA-Homologien (84 - 103 %) ist es nicht mehr gerechtfertigt, von 3 getrennten Arten zu sprechen, sondern *L.trichodes*, *L.heterohiochii* und *L.fructivorans* müssen als eine Art betrachtet werden, die aus Prioritätsgründen als *L.fructivorans* bezeichnet wird (Weiss et al., 1983).

Innerhalb der untersuchten Stämme traten sehr hohe DNA-DNA-Homologien (über 70 %) außer zwischen den schon erwähnten Arten nur noch zwischen dem früher als *L.caucasicus* (Pederson, 1938) bezeichneten Kefirisolat 20485 und 2 neueren Kefirisolaten (Kunath, Dissertation 1983) *L.kefir* 20587 und E 40 auf. Die Homologiewerte zwischen 74 und 85 % zeigen die Zugehörigkeit der Stämme zur gleichen Art und zwar zur Species *L.kefir* (Kandler und Kunath, 1983), da es sich bei *L.kefir* 20587 um den Typstamm dieser Art handelt.

Eine relativ hohe DNA-DNA-Homologie (63 %) ergab die Hybridisierung zwischen dem Typstamm von *L.reuteri* (20016) und Stamm 20056, der ebenso wie Stamm 20059 zu den Stämmen gehört, die in der Aufsammlung von Köhl (Diplomarbeit, 1972) zu *L.reuteri* gestellt wurden. Die etwa 60 %ige Homologie deutet zwar auf eine enge Verwandtschaft zu *L.reuteri* 20016, aber eine Zuordnung zu dieser Art ist nicht gerechtfertigt, was mit den Befunden von Vescovo et al. (1979) übereinstimmt. Auch Stamm 20059 läßt sich weder *L.reuteri* noch einer anderen *Lactobacillus*-Art zuordnen, da er gegenüber sämtlichen heterofermentativen Laktobazillen mit Murein des Lys-Asp-Typs nur niedrige Homologien aufweist.

Die aufgrund von sehr ähnlichen Eigenschaften (u. a. gemeinsames Antigen; einzige Unterscheidungsmerkmale: Melezitosevergärung und Folsäurebedürfnis) von vielen Autoren (Gasser und Sebal, 1966; Williams und Sadler, 1971) vermutete sehr enge Verwandtschaft zwischen *L.brevis* und *L.buchneri* läßt sich durch die DNA-DNA-Hybridisierungen, die nur ca. 20 % Homologien

zwischen den Typstämmen der beiden Arten ergaben, nicht bestätigen. Es handelt sich trotz vieler phänotypischer Ähnlichkeiten eindeutig um 2 verschiedene Arten.

Ebenfalls zu *L.buchneri* rechnen könnte man aufgrund der identischen phenetischen Eigenschaften *L.frigidus*. Die nur 28 %ige DNA-DNA-Homologie zeigt aber, daß nur eine geringe phylogenetische Ähnlichkeit zwischen diesen beiden Arten besteht, was in Einklang mit den Ergebnissen von Vescovo et al. (1979) steht.

L.pastorianus 20197, *L.collinoides* 27612, *L.malefermentans* 11306, *L.hilgardii* 20176 und *L.bifermentans* 20003 erwiesen sich als mit keinem der untersuchten Stämme eng verwandt. Die 48 %ige DNA-DNA-Homologie zwischen *L.pastorianus* 20197 und dem Typstamm von *L.brevis*, die Vescovo et al. (1979) mit der Filtermethode ermittelt hatten und die auf eine relativ enge Verwandtschaft schließen ließ, konnte nicht bestätigt werden. Die niedrigen Homologien dieses *L.pastorianus*-Stammes mit den übrigen Laktobazillen (19 - 44 %) sprechen vielmehr ebenso wie der vergleichsweise hohe G+C-Gehalt von 49 mol% für die Zugehörigkeit zu einer eigenen Art (= *L.pastorianus*).

2.2 PHYLOGENETISCHE BEZIEHUNGEN ZWISCHEN HETEROFERMENTATIVEN LACTOBACILLUS- UND LEUCONOSTOC-ARTEN MIT ÄHNLICHEN MUREIN-CHEMOTYPEN

Zur Klärung der phylogenetischen Beziehungen zwischen Vertretern der Gattung *Leuconostoc* und denjenigen heterofermentativen Laktobazillen, deren Mureintyp dem von *Leuconostoc*-Arten ähnelt, wurden mit einer größeren Anzahl von *Leuconostoc*-Stämmen und Betabakterien DNA-DNA-Homologiestudien durchgeführt.

2.2.1 Physiologische und biochemische Merkmale

Die Identität der Stämme wurde durch die Bestimmung der Zuckervergärungsspektren überprüft. Außerdem wurde der G+C-Gehalt der DNA und von den Betabakterien auch die elektrophoretische Beweglichkeit der LDHs ermittelt. Die Ergebnisse dieser Bestimmungen sind zusammen mit dem Mureintyp aus Tab. 9 zu ersehen.

Vom Typstamm von *L.sanfrancisco* wurde eine Zellwandanalyse durchgeführt, da diesbezüglich bisher keine Daten vorlagen. Es handelt sich um den Lys-Ala-Typ. Die Mureintypen der übrigen Stämme wurden den entsprechenden Publikationen (Holzapfel, Dissertation 1969; Kandler, 1970; Weiss, persönliche Mitteilung, Holzapfel und Van Wyk, 1982) entnommen.

Die *Leuconostoc*-Arten lassen sich durch ihre teilweise sehr unterschiedlichen Zuckerspektren gut unterscheiden, stimmen aber in ihrem G+C-Gehalt weitgehend überein. Fast alle weisen 40 - 42 mol% G+C auf, nur für *Lc.lactis* wurde ein etwas höherer Wert von 45,6 mol% gefunden.

Die verschiedenen *Lactobacillus*-Arten unterscheiden sich nicht nur in ihrem Zuckervergärungsspektrum und teilweise in ihrem Mureintyp, sondern auch in der elektrophoretischen Beweglichkeit der LDHs und in ihrem G+C-Gehalt.

Bei *L.viridescens* war keine D-LDH-, bei *L.kandleri* keine L-LDH-Aktivität im Gel nachweisbar.

2.2.2 DNA-DNA-Hybridisierungen

2.2.2.1 Ergebnisse der Hybridisierungen nach der Filtermethode

Die Ergebnisse der Hybridisierungen nach der Filtermethode sind in Tabelle 10 dargestellt.

Species	Stamm	Spektrum an vergärbaren Zuckern										Zellwand:	Elektrophoretische Beweglichkeit,* der		mol% G+C			
		Ribose	Arabinose	Xylose	Sorbit	Mannit	Raffinose	Melibiose	Rhamnose	Saccharose	Maltose		Trehalose	Lactose		Cellulose	Salicin	
Lc.mesenteroides	20343	+	+	+	-	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	0	0	39,9
Lc.mesenteroides	20193	+	+	(+)	-	-	+	+	-	+	+	-	+	-	-	0	0	41,1
Lc.cremoris	20346	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0	0	40,1
Lc.mesenteroides subsp.amelibiosum	20188	(+)	+	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	0	0	41,6
Lc.lactis	20202	-	+	-	-	-	-	-	-	+	+	-	+	-	-	0	0	45,6
Lc.spec.	20189	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	0	0	40,1
Lc.paramesenteroides	20288	+	+	-	-	(+)	+	-	-	+	+	+	(+)	-	-	0	0	40,4
Lc.paramesenteroides	20186	-	+	-	-	-	+	+	-	+	+	+	+	+	-	0	0	38,7
Lc.oenos	20252	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	+	0	0	0	40,4
L.viridescens	20410	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	2,03	43,6
L.confusus	20196	+	-	+	-	-	-	-	-	-	+	-	-	+	0	2,08	1,82	47,0
L.confusus	20194	(+)	-	+	-	-	+	-	+	+	+	+	+	+	+	0	0	46,3
L.spec.	1 CH ₄	(+)	+	+	-	-	-	-	+	+	+	-	-	+	+	0	0	46,4
L.minor	20014	+	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	0	2,08	1,5	41,4
L.halotolerans	20190	+	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	-	-	0	1,75	1,30	44,8
L.kandleri	20593	+	+	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-	-	2,10	-	41,9
L.fructosus	20349	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1,32	1,14	44,1
L.sanfrancisco	20451	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	1,15	1,05	35,5

0 = nicht getestet * bezogen auf Kaninchen L-LDH iso 1 (= 1,0)

Tab. 9: Physiologische und biochemische Merkmale der Leuconostoc-Arten und Betabakterien mit ähnlichem Mureintyp

^3H -markierte DNA von filtergebundene DNA von		Lc.mesenteroides 20343	Lc.mesenteroides 20193	Lc.lactis 20202	Lc.paramesenteroides 20288	L.viridescens 20410	L.confusus 20196
Lc.mesenteroides	20343	100	24	25	8	10,5	8
Lc.cremoris	20346	77	20	15	7	6	6
Lc.mesenteroides	20193	26	100	22	12	7,5	6
Lc.lactis	20202	24	23	100	11	11	10
Lc.mesenteroides subsp.amelibiosum	20188	39	34	32	22	9	15
Lc.spec.	20189	22,5	17	15	13	8,5	7
Lc.paramesenteroides	20288	8	7	10	100	15	18
Lc.paramesenteroides	20186	15	11	11	44	17	19
Lc.oenos	20252	8	5	3	7	5	2
L.viridescens	20410	11	7	10	15	100	18
L.confusus	20196	10	10	13,5	21	21	100
L.confusus	20194	11	9	11	21	16	73
L.spec. I CH ₄		18	16	14	29	21	48,5
L.minor	20014	10	9	8	18	30	15
L.halotolerans	20190	11	6,5	7	15	12	10
L.kandleri	20593	6	6	6	12,5	9	8,5
L.fructosus	20349	12	9,5	13	11	10	8
L.sanfrancisco	20451	7	6	7,5	10	5	4,5
L.buchneri	20057	14	-	-	-	10	-
L.fermentum	20052	11	-	-	-	8	-
L.bif fermentans	20003	8	-	-	-	6	-

Tab. 10: % DNA-DNA-Homologien (ermittelt mit Hilfe der Filtermethode)

Beim Einsatz ^3H -markierter DNA des Typstamms von Lc.mesenteroides (20343) ergab sich nur mit dem Typstamm von Lc.cremoris (20346) eine sehr hohe Homologie (77 %), nicht aber mit den als Lc.mesenteroides klassifizierten Stämmen 20193 und 20188. Mit Lc.mesenteroides 20193 wurden 26 % Homologien gefunden, mit dem von Holzapfel (Dissertation, 1969) als Lc.mesenteroides subsp. amelibiosum bezeichneten Stamm 20188 39 %. Mit allen übrigen untersuchten Leuconostoc-Arten und Betabakterien hybridisierte die ^3H -markierte DNA von Lc.mesenteroides 20343 in geringerem Maße, wobei die Hybridisierungen mit den meisten Leuconostoc-Stämmen etwas höhere Werte (über 20 %) ergaben als die mit den heterofermentativen Laktobazillen (fast alle unter 15 %).

Die Verwendung ^3H -markierter DNA des 2. Vertreters von Lc.mesenteroides (20193) bestätigte den geringen Homologiegrad mit dem Typstamm dieser Art (24 %). Die höchste Homologie wurde mit Lc.mesenteroides subsp. amelibiosum 20188 gefunden (34 %).

Die Hybridisierung mit ^3H -markierter DNA des Typstamms von Lc.lactis (20202) ergab mit keinem der untersuchten Stämme eine hohe Homologie. Den höchsten Wert lieferte auch hier Lc.mesenteroides subsp. amelibiosum 20188 (32 %).

Auffällig sind die niedrigen Homologien sowohl der Stämme Lc.mesenteroides 20343 und Lc.mesenteroides 20193 wie auch von Lc.lactis 20202 gegenüber den übrigen Leuconostoc-Arten Lc.paramesenteroides und Lc.oenos.

Bei der Hybridisierung mit ^3H -markierter DNA des Typstamms von Lc. paramesenteroides (20288) ergab sich mit dem 2. Vertreter dieser Art (Stamm 20186) eine DNA-DNA-Homologie von 44 %, ein Wert, der deutlich unter den 70 - 100 % Homologien liegt, die man allgemein als Voraussetzung dafür ansieht, daß 2 Stämme als Angehörige ein- und derselben Art betrachtet werden können.

Mit *Lc.mesenteroides* und *Lc.lactis* wurden nur niedrige Homologien (8 - 12 %) gefunden, die Werte gegenüber *L.confusus*-Stämmen und Stamm *L.spec. I CH₄* waren dagegen deutlich höher (21 - 29 %).

Beim Einsatz von ³H-markierter DNA des Typstamms von *L.viridescens* (20410) wurden mit fast allen *Leuconostoc*-Stämmen nur sehr niedrige Homologien (5 - 11 %) gefunden, mit einigen heterofermentativen Laktobazillen mit ähnlichem Mureintyp (z. B. *L.confusus*, *L.minor* und *L.halotolerans*) und *Lc. paramesenteroides* 20288 und *Lc.paramesenteroides* 20186 ergaben sich dagegen etwas höhere Homologiewerte (12 - 21 %).

Die Hybridisierung mit ³H-DNA des Typstamms von *L.confusus* (20196) bestätigte die Zugehörigkeit von Stamm 20194 zu dieser Art (73 %ige Homologie), und die fast 50 %ige Homologie zu dem Abwasserisolat *L.spec. I CH₄* läßt eine nahe Verwandtschaft dieses Stamms zu *L.confusus* vermuten. Die DNAs der *Leuconostoc*-Stämme und der übrigen Laktobazillen hybridisierten alle nur schwach mit *L.confusus*-DNA.

Die niedrigsten Homologiewerte (2 - 8 %) ergaben die Hybridisierungen mit *Lc.oenos*. Diese Art scheint keinerlei Verwandtschaft zu den übrigen untersuchten Stämmen aufzuweisen.

Für die Vertreter von *L.halotolerans*, *L.kandleri*, *L.fructosus* und *L.sanfrancisco* konnten mit keiner der eingesetzten ³H-markierten DNAs Homologiewerte über 15 % festgestellt werden.

Die als Vertreter des Lys-Asp- bzw. Orn-Asp-Mureintyps eingesetzten Stämme der Arten *L.buchneri*, *L.fermentum* und *L.bifermentans* zeigten erwartungsgemäß keine signifikanten Homologien (6 - 14 %) mit den Vertretern von Arten mit den Mureintypen Lys-Ala, Lys-(Ala)₂, Lys-Ala-Ser, Lys-Ser-(Ala)₂ und Lys-Ala-Gly-(Ala)₂.

2.2.2.2 Ergebnisse der Hybridisierungen nach der Renaturierungsmethode

Die Ergebnisse der Hybridisierungen nach der Filtermethode wurden zum Teil durch Anwendung einer 2. Methode (Renaturierungsmethode) überprüft bzw. ergänzt (Tab. 11).

Der geringe Homologiegrad zwischen den beiden Lc.mesenteroides-Stämmen 20343 und 20193 bestätigte sich (37 %). Auf der anderen Seite ergaben die Hybridisierungen der von Holzapfel als Lc.paramesenteroides subsp. lactophilum bezeichneten Stämme 20185 und 20201 (Holzapfel, Dissertation 1969) hohe Homologien (66 bzw. 73 %) mit dem Typstamm von Lc.mesenteroides (20343). Die DNA des letzteren hybridisierte mit der DNA von Lc.cremoris-Stämmen zu 89 - 102 %, mit der von Lc.dextranicum 20484 zu 83 %.

Lc.dextranicum, Lc.cremoris und die als Lc.paramesenteroides subsp. lactophilum bezeichneten Stämme (20185 und 20201) können also zusammen mit dem Typstamm von Lc.mesenteroides zu einer Homologiegruppe zusammengefaßt werden.

Zwischen den Lc.mesenteroides subsp. amelibiosum-Stämmen 20188 und 10882 wurden 66 % DNA-DNA-Homologien gefunden. Die Hybridisierungen dieser Stämme mit den Vertretern der Homologiegruppe von Lc.mesenteroides ergaben dagegen nur niedrige Werte (26 - 42 %).

Die verschiedenen Stämme von Lc.lactis (533, 20202, 20192, 2037) erwiesen sich als untereinander hoch-homolog und bilden somit eine Homologiegruppe, der außerdem L.batatas 15520 angehört, denn dieser Stamm ergab mit dem Typstamm von Lc.lactis eine 87 %ige Homologie.

Von Lc.paramesenteroides wurden die DNAs von 3 verschiedenen Stämmen miteinander hybridisiert. Mit dem Typstamm 20288 zeigte Lc.paramesenteroides 871 eine hohe (88 %ige), Lc.paramesenteroides 20186 dagegen eine niedrige (38 %ige) Homologie.

Tab. 11: % DNA-DNA-Homologien
(ermittelt mit Hilfe der Renaturierungsmethode)

Stamm	20343	20200	20201	20185	20193	20188	533	20192	15520	20288	20189
<u>C. mesenteroides</u>											
0343	/	102*	66*	73	37	41	26*		17*	31	41
<u>C. dextranicum</u>											
0484	83*	100*	71*			26*				21*	
<u>C. cremoris</u>											
0346	89			81		42*					
<u>C. cremoris</u>											
0200	102*	/									
<u>C. paramesenteroides</u>											
ubsp. lactophilum											
0185	73		96*	/						13*	
<u>C. paramesenteroides</u>											
ubsp. lactophilum											
0201	66*		/	96*		41*				27*	
<u>C. mesenteroides</u>											
0193	37				/	33*	22*		24*	18	28
<u>C. mesenteroides</u>											
ubsp. amelibiosum											
0188	41		41*		33	/	48*	45*		34	45
<u>C. mesenteroides</u>											
ubsp. amelibiosum											
0882		38*				66*	22*	36*			
<u>C. lactis</u>											
0202								74*	102*		
<u>C. lactis</u>											
033	26*						/	103*	87*		
<u>C. lactis</u>											
0192					27*		102*	/			
<u>C. lactis</u>											
037					27*		70*		70*		38*
<u>C. batatas</u>											
5520	17*				24*		87*		/	17*	
<u>C. paramesenteroides</u>											
0288	31		27*	13*	18	34	20*		17*	/	25*
<u>C. paramesenteroides</u>											
071										88*	
<u>C. paramesenteroides</u>											
0186	36		35*		29	31	32*			38	31
<u>C. spec.</u>											
0189	41				28	45				25	/

Die mit * versehenen Werte wurden von Holzapfel (unveröffentlicht) übernommen,
Typstämme wurden unterstrichen

Für den aus Sauerkraut isolierten *Leuconostoc*-Stamm Lc.spec. 20189 wurde mit keinem der untersuchten Stämme eine sehr hohe DNA-DNA-Homologie (über 70 %) gefunden. Er konnte daher wie auch *Lc.mesenteroides* 20193 in keine der Homologiegruppen eingeordnet werden.

2.2.3 Taxonomie der untersuchten *Leuconostoc*- und *Lactobacillus*-Arten

- 1) Für *Lc.mesenteroides*, die Typspecies der Gattung ergibt sich folgendes:

Die aufgrund von großen Ähnlichkeiten der LDHs und Glucose-6-phosphatdehydrogenasen (Hontebeyrie und Gasser, 1975; Gasser und Hontebeyrie, 1977) schon früher vermutete und durch die Ergebnisse der DNA-DNA-Homologiestudien von Garvie (1976) und Hontebeyrie und Gasser (1977) bestätigte enge Verwandtschaft von *Lc.dextranicum* und *Lc.cremoris* zu *Lc.mesenteroides* wird auch durch unsere Hybridisierungsbe- funde erkennbar. Die von Garvie 1983 vorgenommene Einglie- derung von *Lc.cremoris* und *Lc.dextranicum* in die Art *Lc.mesenteroides* ist also gerechtfertigt. Alle in die Unter- suchung einbezogenen Stämme von *Lc.cremoris* und *Lc.dex- tranicum* wiesen sehr hohe Homologien mit dem Typstamm von *Lc.mesenteroides* auf.

So ergab die Hybridisierung mit dem Typstamm von *Lc.dextranicum* (20484) eine 83 %ige Homologie und mit dem von *Lc.cremoris* (20346) eine 77 %ige Homologie bei Anwen- dung der Filtermethode bzw. einen Wert von 89 % bei der Renaturierungsmethode. Für den 2. Stamm von *Lc.cremoris* (20200) wurde ein ähnlich hoher Homologiewert (102 %) erhalten. *Lc.cremoris* kann also trotz großer phänotypischer Unterschiede nur als eine in der Milchwirtschaft häufig als Starter verwendete Variante von *Lc.mesenteroides* betrachtet werden, die offenbar die Fähigkeit zur Vergärung einer ganzen Reihe von Zuckern (Pentosen, Maltose, Saccharose, Trehalose, Cellobiose, Melibiose, Raffinose und Salicin), die

in der Milch kaum oder gar nicht vorhanden sind, verloren und sich auf die Verwertung der hauptsächlich vorkommenden Lactose spezialisiert hat.

Auch die von Holzapfel (Dissertation, 1969) als Lc.paramesenteroides subsp.lactophilum bezeichneten Stämme 20185 und 20201 erwiesen sich als hoch-homolog mit dem Typstamm von Lc.mesenteroides und können somit als Vertreter dieser Art angesehen werden, obwohl sie sich durch einige physiologische Eigenschaften deutlich vom Typstamm unterscheiden. So vermögen diese Stämme Peroxyd, aber kein Dextran zu bilden, während der Dextranbildner Lc.mesenteroides 20343 kein Peroxyd zu produzieren vermag (Holzapfel, 1969). Die physiologischen Merkmale der Dextran- und Peroxydbildung, deren Bedeutung u. a. Whittenbury (1966) hervorgehoben hatte, oder auch die Pentosenvergärung, die früher zur Unterscheidung von Leuconostoc-Arten bzw. Einordnung von Neuisolaten in bekannte Arten herangezogen wurde - z. B. wurde Lc.dextranicum wegen seiner Unfähigkeit, Pentosen zu vergären von Lc.mesenteroides unterschieden (Hucker and Pederson, 1931) - haben offenbar stammesgeschichtlich gesehen keine Bedeutung und können daher nicht zur Erkennung von phylogenetischen Beziehungen beitragen. Es sind von diesen Merkmalen offensichtlich nur wenige Gene betroffen, die nur einen sehr geringen Anteil am Gesamtgenom ausmachen, so daß die Organismen trotzdem eine sehr hohe DNA-DNA-Homologie aufweisen.

Die Zuordnung der Stämme 20193, 20188 und 10882 zu Lc.mesenteroides, die aus ihrer ursprünglichen Bezeichnung hervorgeht, kann nicht aufrechterhalten werden.

20193 ist der in der klassischen Arbeit zur Aufklärung des Mechanismus der heterofermentativen Milchsäuregärung von de Moss (1951) verwendete Stamm, der sich dadurch auszeichnet, daß er auch in Gegenwart von Sauerstoff keine Essigsäure sondern nur Alkohol bildet. In Übereinstimmung

mit den Ergebnissen von Garvie (1976) und Hontebeyrie und Gasser (1977) zeigte er bei beiden Hybridisierungstechniken eine nur geringe DNA-DNA-Homologie mit dem Typstamm von *Lc.mesenteroides* (Filtermethode: 26 bzw. 24 %, Renaturierungsmethode: 37 %). Da er auch mit keinem anderen Vertreter der *Leuconostoc*-Arten eine höhere Homologie aufwies, ist es gerechtfertigt, diesen Stamm als Vertreter einer neuen Art anzusehen. Eine Unterscheidung von *Lc.mesenteroides* erscheint wegen der großen Ähnlichkeit der physiologischen Merkmale (fast identisches Zuckervergärungsspektrum, Dextranbildung und keine Peroxydbildung) schwierig. Ob sich das Merkmal der Äthanolbildung in Gegenwart von O_2 als Unterscheidungskriterium eignet, kann erst entschieden werden, wenn weitere mit diesem Stamm hochhomologe Stämme gefunden und daraufhin untersucht worden sind.

Die von Holzapfel (Dissertation, 1969; Kandler, 1970) aufgrund des Fehlens der Melibiose- und Raffinosevergärung und ihres unterschiedlichen Mureintyps ($Lys-Ala_2$) von *Lc.mesenteroides* abgetrennten und als *Lc.mesenteroides subsp. amelibiosum* bezeichneten Stämme 20188 und 10882 zeigen nach den Ergebnissen der Renaturierungsmethode zwar untereinander eine relativ hohe Homologie (66 %), mit den übrigen *Leuconostoc*-Arten sind sie aber nur entfernt verwandt. Sie lassen sich in keine der bereits bestehenden Arten einordnen und müssen somit als Vertreter einer neuen Art angesehen werden, für die der Name *Lc.amelibiosum* gewählt wird. Nach den Ergebnissen der Hybridisierungen nach der Filtermethode scheinen diese Stämme eine gewisse Sonderstellung einzunehmen, da Stamm 20188 mit *Lc.mesenteroides* und *Lc.lactis* deutlich höhere Homologien (32 - 39 %) als die übrigen *Leuconostoc*-Stämme aufweist. Auch mit *Lc.paramesenteroides* 20288 ergab sich ein höherer Homologie-wert (22 %) als bei allen anderen. Möglicherweise stellen diese Stämme eine Art Bindeglied zwischen den bisher bekannten Arten dar.

Beschreibung der Art Lc.amelibiosum

(basierend auf den Befunden von Holzapfel, Dissertation 1969 und eigenen Bestimmungen)

Lc.amelibiosum sp.nov.

(a'me.li.bi.o'sum, griech. Vorsilbe a = nicht; neulatein. Adj. melibiosum = sich auf das Disaccharid Melibiose beziehend; amelibiosum = nicht-melibiose-vergärend)

Gram-positive, nicht-sporenbildende unregelmäßige Kokken (0,8-1,0 × 1,0-1,2 µm) in Paaren oder kurzen Ketten.

Unbeweglich. Fakultativ anaerob.

Wachstum bei 15°C, nicht bei 5° und 45°C.

Heterofermentativ; CO₂, Essigsäure (Äthanol) und D-Lactat aus Hexosen und Gluconat.

Arabinose, Cellobiose, Fructose, Glucose, Maltose, Saccharose, Salicin, Trehalose werden vergoren; keine Vergärung von Lactose, Mannit, Melibiose, Raffinose, Rhamnose, Ribose, Sorbit und Xylose.

Dextranbildung aus Saccharose; keine Peroxydbildung.

Keine Freisetzung von Ammoniak aus Arginin, keine Nitratreduktion. Katalase-negativ.

Zellwand enthält Murein des Lys-(Ala)₂-Typs.

G+C-Gehalt der DNA: 41,6 mol% (Tm).

Habitat: Zuckerlösung

Typstamm: DSM 20188

- 2) Die Lc.lactis zugeordneten Stämme erwiesen sich als genetisch einheitlich und mit dem Typstamm hoch-homolog. Auch der von Kitahara (1949) als L.batatas bezeichnete Stamm 15520 zeigte eine sehr hohe DNA-DNA-Homologie (87 %) mit Lc.lactis und kann somit in diese Art eingegliedert werden. Der Name L.batatas wird also mit Recht nicht in den "approved lists of bacterial names" (Skerman, 1980) aufgeführt.

- 3) Lc.paramesenteroides, der früher als nicht-dextranbildende Variante von Lc.mesenteroides (Garvie, 1960) angesehen, bei späteren DNA-DNA-Hybridisierungen von Garvie (1976) aber als mit dieser Art nur wenig verwandt erkannt wurde, zeigte auch bei uns kaum DNA-DNA-Homologien mit Lc.mesenteroides. Eine sehr hohe Homologie (88 %) mit dem Typstamm von Lc.paramesenteroides (20288) ergab nur Lc.paramesenteroides 871, während für Lc.paramesenteroides 20186 ein Homologie-wert von 44 % bei Anwendung der Filtermethode und von 38 % bei der Renaturierungsmethode ermittelt wurde. Somit besteht zwischen letzterem und dem Typstamm von Lc.paramesenteroides zwar eine deutliche Verwandtschaft, jedoch nicht auf dem Artniveau.

Auffallend sind die niedrigen Homologien, die der Typstamm von Lc.paramesenteroides gegenüber den übrigen Leuconostoc-Stämmen aufweist. Sie liegen bei der Filtermethode - abgesehen von Lc.amelibiosum 20188 - bei maximal 13 %. Demnach ist Lc.paramesenteroides mit Lc.mesenteroides, Lc.lactis und Lc.oenos nur wenig verwandt und steht den heterofermentativen Laktobazillen L.viridescens und L.confusus näher, da im letzteren Fall etwas höhere DNA-DNA-Homologien erreicht wurden (15 - 21 %). Ähnliche Werte ergaben auch die Hybridisierungen mit L.minor, L.halotolerans und L.kandleri (12,5 - 18 %).

- 4) Lc.oenos zeigte mit keinem der übrigen Leuconostoc-Stämme eine DNA-DNA-Homologie von mehr als 8 %, d. h. er ist von diesen phylogenetisch so weit entfernt, daß seine Verwandtschaft mit der DNA-DNA-Hybridisierungsmethode nicht mehr erfaßt werden kann. Aufgrund der unterschiedlichen physiologischen Eigenschaften wie z. B. Wachstum bei pH 4,2, einem für die Kultivierung der übrigen Leuconostoc-Stämme zu sauren pH-Wert und die von den übrigen Leuconostoc-Arten sehr verschiedene elektrophoretische Beweglichkeit der D-LDH (Garvie, 1967) kann diese Species auch leicht von den übrigen abgetrennt werden.

- 5) Ein aus Sauerkraut isolierter Stamm Lc.spec. 20189, der morphologisch durch die für *Leuconostoc*-Arten ungewöhnlich großen Zellen auffiel, aber aufgrund seiner physiologischen Eigenschaften als Vertreter von *Leuconostoc* klassifiziert worden war, zeigte mit keiner der bekannten *Leuconostoc*-Arten eine enge Verwandtschaft. Die Homologiewerte lagen bei der Filtermethode bei 22,5 % gegenüber dem Typstamm von *Lc.mesenteroides* und zwischen 13 und 17 % gegenüber dem von *Lc.mesenteroides* abzutrennenden Stamm 20193 und den Vertretern von *Lc.lactis* und *Lc.paramesenteroides*. Daß er auch mit *Lc.amelibiosum* 20188 nicht eng verwandt sein kann, zeigten die Hybridisierungen nach der Renaturierungsmethode, wo eine 45 %ige Homologie gefunden wurde. Es dürfte sich demnach um den Vertreter einer neuen Species von *Leuconostoc* handeln.

- 6) Keine hohen Homologien ergaben die Hybridisierungen zwischen Vertretern der Gattung *Leuconostoc* und L.confusus, der zu den Laktobazillen gehört, für die aufgrund des ähnlichen Mureintyps am ehesten eine Verwandtschaft mit den *Leuconostoc*-Arten vermutet werden konnte.

Die Hybridisierung des Typstamms von *L.confusus* (20196) mit *L.confusus* 20194, bei der Vescovo et al. (1979) nur 45 % DNA-DNA-Homologien gefunden hatten, ergab bei uns in Übereinstimmung mit den Befunden von Garvie (1976: 86 % zwischen den betreffenden NCDO-Stämmen) eine sehr hohe Homologie (73 %). Demnach gehört der Stamm 20194 trotz phänotypischer Unterschiede (Zuckervergärungsspektrum) zu der Art *L.confusus*. Eine fast 50 %ige Homologie mit dem Typstamm von *L.confusus* ergab sich für das Abwasserisolat *L.spec.1* CH₄. Die Zellwand dieses Stamms weist den Lys-(Ala)₂-Typ auf, wobei aber ein Teil des Alanins durch Serin ersetzt ist (Weiss, unveröffentlicht). Der Lys-(Ala)₂-Mureintyp wurde auch bei der früher als *L.coprophilus* bezeichneten Art gefunden, von der aber kein Stamm mehr

existiert. Da *L.spec.* I CH₄ auch in seinen physiologischen Eigenschaften mit denen von *L.coprophilus* (Holzapfel und Kandler, 1969) übereinstimmt, handelt es sich bei ihm möglicherweise um einen Vertreter dieser Art.

- 7) *L.viridescens* zeigte gegenüber *L.confusus*, *L.minor* und *L.halotolerans* Homologiewerte zwischen 12 und 30 %, was für eine gewisse Verwandtschaft zu diesen Arten spricht.

Auf der anderen Seite ergaben die Hybridisierungen mit *Leuconostoc*-Arten mit Ausnahme von *Lc.paramesenteroides* (15 %) ebenso wie mit den heterofermentativen Laktobazillen mit Lys-Asp-Typ bzw. Orn-Asp-Typ *L.buchneri*, *L.fermentum* und *L.bifermentans* deutlich niedrigere Werte (6 - 11 %). Eine nähere Verwandtschaft zwischen den *Leuconostoc*-Arten und *L.viridescens* als Vertreter der Gruppe von Betabakterien mit ähnlichem oder identischem Mureintyp scheint demnach nicht vorzuliegen.

L.fructosus und *L.sanfrancisco* zeigten weder mit *L.confusus* oder *L.viridescens* noch mit den *Leuconostoc*-Stämmen signifikante Homologien.

3 IDENTIFIZIERUNG VON BETABAKTERIEN AUS SAUERTEIG UND BIER

3.1 Heterofermentative Laktobazillen aus Sauerteig

Im Zuge der Untersuchung der Mikroflora des Sauerteigs isolierten Spicher und Schröder (1978) neben homofermentativen Stämmen eine Vielzahl von heterofermentativen *Lactobacillus*-Arten aus sogenannten Reinzuchtsauerteigen. Neben *L.brevis*, *L.buchneri*, *L.fermentum* und *L.fructivorans* fanden die Autoren in bestimmten Sauerteigen dominierende Stämme, die sie aufgrund des sehr ähnlichen Verhaltens bei der Sauerteiggärung als Varietät von *L.brevis* ansahen und als *L.brevis* var. *lindneri* bezeichneten. Nach Spicher und Rabe (1983) nehmen diese Stämme in technologischer Hinsicht eine Sonderstellung ein, da nur diese "Sauerteigbakterien" in der Lage sind, unter den verschiedenen Führungsbedingungen die für die Ausbildung einer guten Brotqualität erforderlichen Veränderungen des pH-Wertes, des Säuregrades und des Milch-/Essigsäureverhältnisses bzw. Gärungsquotienten herbeizuführen.

Ob diese Stämme wirklich enge Verwandte von *L.brevis* darstellen, ob sie zu einer anderen Art gehören oder ob es sich um eine eigene, neue Art handelt, sollte im folgenden durch DNA-DNA-Hybridisierungen festgestellt werden. 3 Stämme wurden dazu ausgewählt (242-1, 242-2, 73).

3.1.1 Physiologische und biochemische Merkmale

Zunächst wurden die physiologischen und biochemischen Merkmale bestimmt. (Tab. 12).

Die Anzucht erfolgte in *L.sanfrancisco*-Medium. Die Zellwandanalyse ergab das Vorliegen des Lys-Ala-Typs anstelle des weit verbreiteten und auch bei *L.brevis* vorliegenden Lys-Asp-Typs.

Tab. 12: Physiologische und biochemische Eigenschaften der Sauerteigisolate

Stamm	Spektrum an vergärbaren Zuckern									Murein- typ	Elektro- phoretische Beweglich- keit* von		mol % G+C
	Ribose	Arabinose	Xylose	Melibiose	Maltose	Lactose	Glucose	Fructose	Gas aus Gluconat		D-LDH	L-LDH	
242-1	-	-	-	-	+	-	+	-	+	Lys-Ala	0,99	0,96	34,4
242-2	-	-	-	-	+	-	+	-	0	Lys-Ala	n.b.	n.b.	33,7
73	-	-	-	-	+	-	+	+	+	Lys-Ala	1,07	0,98	33,3
L.sanfrancisco 20451	-	-	-	-	+	-	+	-	+	Lys-Ala	1,15	1,05	35,5

* bezogen auf Kaninchen-L-LDH iso I (= 1,0) n.b. = nicht bestimmt

Kein Stamm vergor Sorbit, Mannit, Raffinose, Rhamnose, Saccharose, Trehalose, Cellobiose oder Salicin.

Tab. 13: % DNA-DNA-Homologien (bestimmt nach der Renaturierungsmethode)

Stamm		242-1	242-2	73	20451
L.brevis var.lindneri	242-1	/	99	85	100
L.brevis var.lindneri	242-2	99	/	84	101
L.brevis var.lindneri	73	85	84	/	97
L.sanfrancisco	20451	100	101	97	/
L.fructosus	20349				33
L.trichodes	1985		29		
L.reuteri	20016		42		
L.malefermentans	11306		36		
L.reuteri	20059		38		
L.hilgardii	20176		41		

Teichonsäuren waren nicht nachzuweisen. Das Spektrum an vergärbaren Zuckern ist sehr eng begrenzt. Neben Glucose, Gluconat und Maltose wurde nur im Falle von Stamm 73 auch Fructose vergoren.

Von 2 Stämmen (242-1 und 73) wurde die elektrophoretische Beweglichkeit des LDHs im Polyacrylamidgel ermittelt. Bei beiden Stämmen wanderten beide LDHs fast gleich weit wie die Referenz-Kaninchen L-LDH (iso 1) (D-LDH: 0,99 - 1,07; L-LDH: 0,96 - 0,97). Ein Vergleich mit den Laufstrecken der LDHs bekannter *Lactobacillus*-Arten (Tab. 6 und 9) zeigt, daß außer den *L.sanfrancisco*-LDHs nur die von *L.kefir* eine ähnliche elektrophoretische Mobilität aufweisen.

Die Bestimmung des G+C-Gehalts der Stämme ergab einen für Laktobazillen sehr niedrigen Wert von 33,3 - 34,4 mol%. Ein ähnlich niedriger Wert wurde bisher nur bei *L.sanfrancisco* (35,5 %) gefunden.

Eine enge Verwandtschaft mit *L.brevis* ist aufgrund stark divergierender biochemischer Eigenschaften wie Mureintyp (Lys-Ala statt Lys-Asp), elektrophoretischer Beweglichkeit der LDHs (D-LDH: ca. 1,0 statt 1,64 und L-LDH: 0,96 statt 1,4) und G+C-Gehalt (34 % statt 45 %) nicht zu erwarten.

3.1.2 DNA-DNA-Hybridisierungen

Die Ergebnisse der DNA-DNA-Hybridisierungen nach der Renaturierungsmethode sind in Tabelle 13 zusammengefaßt.

Es wurden neben den Sauerteigisolaten 242-1, 242-2 und 73 die DNA des Typstamms von *L.sanfrancisco*, einem ebenfalls aus Sauerteig stammenden Organismus und außerdem die DNA verschiedener anderer heterofermentativer *Lactobacillus*-Arten mit ähnlichem Mureintyp oder ähnlichem G+C-Gehalt eingesetzt (*L.reuteri* 20016, *L.trichodes* 1985, *L.malefermentans* 11306, *L.reuteri* 20059, *L.hilgardii* 20176, *L.fructosus* 20349).

Die 2 Sauerteigisolate zeigten sowohl untereinander als auch gegenüber *L.sanfrancisco* sehr hohe (84 - 101 %), gegenüber den Vertretern anderer Arten jedoch niedrige Homologiewerte (max. 42 %). Demnach dürfte es sich also um Vertreter der Art *L.sanfrancisco* handeln. Auch der Vergleich der biochemischen und physiologischen Merkmale (Tab. 12) ergibt eine gute Übereinstimmung. Außerdem stammen sie aus demselben Biotop (Sauerteig). Der Typstamm von *L.sanfrancisco* wurde allerdings aus dem speziellen sogenannten "Sanfrancisco-Sauerteig" isoliert, der nach der Stadt benannt ist, wo er vor über 100 Jahren zum 1. Mal bereitet wurde. Offenbar ist diese Art aber auch in den Sauerteigen deutscher Bäckereien verbreitet.

Aufgrund dieser Befunde ist eine Zuordnung der Stämme als Unterart zu *L.brevis* nicht berechtigt.

2.3.2 Isolate aus Bier verschiedener Brauereien

Im Bier treten gelegentlich Infektionen von Bakterien auf, die sich trotz der bakteriostatischen Wirkung der Hopfenbitterstoffe und der niedrigen Lagerungstemperatur vermehren und der betreffenden Brauerei großen wirtschaftlichen Schaden zufügen können, da sie meist eine Trübung, Bodensatz oder Geschmacksbeeinträchtigungen verursachen und damit die Qualität des Bieres stark herabsetzen. Wie die Untersuchungen einer großen Anzahl von Bierproben von Eschenbecher (1969) und Back (1981) gezeigt haben, sind neben *Pediokokken* homo- und heterofermentative *Laktobazillen* die wichtigsten Bierschädlinge.

Die taxonomische Stellung einer Reihe solcher von Back (unveröffentlicht) aus dem Bier verschiedener Brauereien isolierter heterofermentativer *Lactobacillus*-Stämme wurde im Folgenden untersucht.

2.3.2.1. Physiologische und biochemische Merkmale

2.3.2.1.1 Wachstum

Die Isolate wurden parallel auf bierhaltigem Spezialmedium (NBB-Bouillon, Döhler) und auf MRS mit Cenovis-Hefeextrakt (7 g/l) angezogen. Nach mehrtägigem Bebrüten bei 28°C zeigte sich, daß die meisten auf MRS mit Cenovis-Hefe genauso gut wie auf dem Spezialmedium wuchsen. Für einige Stämme (IX 5g, IX 7g, IX 10g), die auf diesen 2 Medien nur schwaches Wachstum zeigten, wurden außerdem MRS mit Mevalonsäure (30 mg/l) und MRS mit frischem Hefekochsaft (Herstellung siehe 11.4.6) (30 ml/l) bei den pH-Werten 5,4 und 6,4 getestet. MRS mit Mevalonsäurezusatz pH 5,4 erwies sich als das für die Anzucht dieser Stämme am besten geeignete Medium.

2.3.2.1.2 Milchsäurebildung und Spektrum an vergärbaren Zuckern

Die Bestimmung der Konfiguration der aus Glucose gebildeten Milchsäure ergab bei allen Stämmen DL-Milchsäure, wobei in den meisten Fällen ein deutlicher Überschuß des L-Isomers (53 - 80 %) auftrat. Außerdem war CO₂-Produktion nachweisbar (Durham-Röhrchen).

Aufgrund von identischen Zuckervergärungsspektren (Tab. 14) lassen sich die Stämme IXA 1b, IX 2b, IXA 3a, IX 5g, IX 6a, IX 7a, IX 7g, IX 8h, IX 10g und KPA zu einer Gruppe (I) zusammenfassen. Sie zeichnen sich durch ihr sehr schmales Zuckervergärungsspektrum und das Unvermögen aus, Pentosen abzubauen. Von den angebotenen Zuckern wurden nur Maltose, Fructose und Glucose vergoren. Die übrigen Stämme waren zur Pentosenvergärung befähigt und vergoren ausnahmslos Maltose, die meisten auch Fructose und einige Melibiose, Saccharose und/oder Melezitose. Von allen außer von Gruppe I wurde aus Gluconat CO₂ freigesetzt, Arginin wurde nur von manchen gespalten.

Tab. 14: Physiologische und biochemische Merkmale der Bierisolate

	Stamm	Spektrum an vergärbaren Zuckern und Argininspaltung														Zellwand: Teichonsäuren	Elektropho- retische Beweglich- keit* der D-LDH L-LDH		G+C- Gehalt (mol%)	
		Ribose	Arabinose	Xylose	Sorbit	Mannit	Raffinose	Melibiose	Melezitose	Rhamnose	Saccharose	Maltose	Trehalose	Lactose	Cellulose		Salicin	Fructose		Glucose
1	IX 6a	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	+	+	-	-
	IX 10g	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	+	+	-	-
	IXA 1b	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	+	+	-	-
	IX 7a	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	+	+	-	-
	IX 2b	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	+	+	-	-
	IX 8h	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	+	+	-	-
	IX 7g	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	+	+	-	-
	IX 5g	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	+	+	-	-
	IXA 3a	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	+	+	-	-
	KPA	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	+	+	-	-
2	IX 9a	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	+	+	+	-
	IX 9b	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	+	+	+	-
3	IV 1c	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	+	+	+	+
	X 3i	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	+	+	+	+
	MO 67/2	-	+	+	+	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	+	+	+	+
	MO 67/3	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	+	+	+	+
	MO 67/4	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	+	+	+	+
	MO 67/5	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	+	+	+	+
	XIA 3b	(+)	+	+	+	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	+	+	+	+
4	XIA 3d	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	+	+	+	+
	XIA 1g	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	+	+	+	+
	MO 38/2	(+)	+	+	+	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	+	+	+	+
	XI 9f	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	+	+	+	+
	X 8h	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	+	+	+	+
	MOO 4/2	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	+	+	+	+
	XIA 1d	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	+	+	+	+
	IX 10b	-	+	+	+	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	+	+	+	+
	X 7g	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	+	+	+	+
	XIA 2h	(+)	+	+	+	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	+	+	+	+
IV 9d	(+)	+	+	+	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	+	+	+	+	
5	IX 6a	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	+	+	-	-
	IX 10g	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	+	+	-	-
	IXA 1b	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	+	+	-	-
	IX 7a	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	+	+	-	-
	IX 2b	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	+	+	-	-
	IX 8h	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	+	+	-	-
	IX 7g	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	+	+	-	-
	IX 5g	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	+	+	-	-
	IXA 3a	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	+	+	-	-
	KPA	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	+	+	-	-
2	IX 9a	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	+	+	+	-
	IX 9b	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	+	+	+	-
3	IV 1c	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	+	+	+	+
	X 3i	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	+	+	+	+
	MO 67/2	-	+	+	+	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	+	+	+	+
	MO 67/3	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	+	+	+	+
	MO 67/4	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	+	+	+	+
	MO 67/5	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	+	+	+	+
	XIA 3b	(+)	+	+	+	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	+	+	+	+
	XIA 3d	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	+	+	+	+
	XIA 1g	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	+	+	+	+
	MO 38/2	(+)	+	+	+	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	+	+	+	+
4	XI 9f	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	+	+	+	+
	X 8h	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	+	+	+	+
	MOO 4/2	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	+	+	+	+
	XIA 1d	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	+	+	+	+
	IX 10b	-	+	+	+	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	+	+	+	+
	X 7g	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	+	+	+	+
	XIA 2h	(+)	+	+	+	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	+	+	+	+
	IV 9d	(+)	+	+	+	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	+	+	+	+
5	IX 6a	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	+	+	-	-
	IX 10g	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	+	+	-	-
	IXA 1b	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	+	+	-	-
	IX 7a	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	+	+	-	-

2.3.2.1.3 Zellwandchemie

Die Zellwandanalyse ergab das Vorliegen des Lys-Asp-Murein-Typs bei sämtlichen Stämmen. Die Vertreter von Gruppe I weisen im Gegensatz zu den meisten übrigen Stämmen, bei denen Glycerinteichonsäuren gefunden wurden, keine Teichonsäuren auf. Auch in der Zellwand von Stamm IX 9a liegt keine Teichonsäure vor. Dieser Stamm unterscheidet sich allerdings ebenso wie Stamm IX 9b im Zuckervergärungsspektrum (Vergärung von Pentosen, Gasbildung aus Gluconat und Nichtvergärung von Fructose) von den Vertretern der Gruppe I.

2.3.2.1.4 Elektrophoretische Beweglichkeit der LDHs

Bezüglich der elektrophoretischen Beweglichkeit der LDHs lassen sich 5 Gruppen von Stämmen mit jeweils identischen Laufstrecken der LDHs unterscheiden.

Die 1. Gruppe bilden die Stämme, die schon aufgrund identischer Zuckervergärungsspektren und dem Fehlen von Teichonsäuren in Gruppe I zusammengefaßt worden waren (IX 6a, IX 10g, IXA 1b, IX 7a, IX 2b, IX 8h, IX 7g, IX 5g, IXA 3a, KPA).

Die LDHs dieser Stämme zeigten ein identisches, von den LDHs der bisher untersuchten Betabakterien unterschiedliches Bandenmuster (L-LDH: 1,14 - 1,20 und D-LDH: 1,56 - 1,66).

Gruppe 2:

Während die D-LDH der Stämme IX 9a und IX 9b etwa gleich weit wanderte wie die der Stämme von Gruppe I, war die Laufstrecke der L-LDH dieser beiden Stämme etwas größer (1,24 - 1,28). Die Co-elektrophorese der LDHs eines Stammes aus Gruppe I mit denen von Stamm IX 9a zeigte deutlich die Nicht-identität der Laufstrecken der L-LDHs.

Gruppe 3:

Für die LDHs der Stämme IV 1c, X 3i, MO 67/2, MO 67/3, MO 67/4 und MO 67/5 wurden die gleichen Laufstrecken wie für den Typstamm von *L.brevis* (20054) (D-LDH: 1,64, L-LDH: 1,40) gefunden.

Gruppe 4:

Während die L-LDH der Stämme von Gruppe 4 (XIA 3b, XIA 3d, XIA 1g, MO 38/2, XI 9f, X 8h, MO04/2, XIA 1d und IX 10b) die gleiche elektrophoretische Mobilität wie die von *L.brevis* zeigte, wanderte die D-LDH dieser Stämme etwas kürzer (1,52 - 1,60). Daß letztere nicht die gleiche Laufstrecke aufweist wie die D-LDH von *L.brevis* 20054, wurde durch Co-elektrophorese bewiesen.

Gruppe 5:

Die Laufstrecken der beiden LDHs der Stämme X 7g, XIA 2h und IV 9d waren fast identisch. So wurde für die L-LDH von Stamm X 7g ein Wert von 1,26 und für die D-LDH von 1,30 ermittelt. Dieselbe elektrophoretische Beweglichkeit zeigten auch die LDHs von *L.buchneri* und *L.frigidus* (siehe Tab. 6).

2.3.2.1.5 G+C-Bestimmung

Mit 34 - 36 mol% wurde bei den Stämmen von Gruppe I ein einheitlicher sehr niedriger G+C-Gehalt der DNA gefunden. Alle bisher bekannten Betabakterien mit dem gleichen Mureintyp (Lys-Asp) weisen einen höheren G+C-Gehalt auf.

Für die DNA der Stämme IX 9a und IX 9b ergaben sich Werte um 39 mol% und für die übrigen Stämme zwischen 40,1 und 44,8 mol%.

2.3.2.2. DNA-DNA-Hybridisierungen

Die Verwandtschaftsbeziehungen der Bierisolate untereinander bzw. zu anderen heterofermentativen *Lactobacillus*-Arten wurden mit Hilfe von DNA-DNA-Hybridisierungen nach der Renaturierungsmethode untersucht.

Gruppe I:

Die Stämme der Gruppe I erwiesen sich auch in genetischer Hinsicht als sehr einheitlich (98 - 102 % Homologien) und somit zur selben Art gehörig (Tab. 15).

Zwischen Gruppe I und *L.fructivorans* sowie *L.malefermentans*, die sich ebenfalls durch ein sehr eng begrenztes Zuckervergärungsspektrum und einen niedrigen G+C-Gehalt auszeichnen, wurden DNA-DNA-Homologien zwischen 48 und 55 % gefunden. Die Werte liegen über dem "Background" der angewandten Hybridisierungstechnik, sprechen also für eine gewisse Verwandtschaft von Gruppe I zu diesen Arten.

Stamm IX 9a aus Gruppe 2, der wie die Vertreter von Gruppe I keine Teichonsäuren besitzt und diesen auch im G+C-Gehalt und der elektrophoretischen Beweglichkeit der LDHs ähnelt, weist mit den Stämmen von Gruppe I eine deutliche Verwandtschaft auf, aber nicht auf dem Artniveau (47 - 63 % Homologien).

Ähnlich hohe Homologiewerte (41 - 58 %) ergaben sich zwischen Gruppe I und den Typstämmen von *L.reuteri* und *L.hilgardii*, die sich in ihrem G+C-Gehalt (ca. 40 mol%) von den Werten der Stämme von Gruppe I (um 35 mol%) nur wenig unterscheiden.

Dagegen zeigten *L.buchneri* und *L.frigidus*, die einen etwa 10 % höheren G+C-Gehalt aufweisen erwartungsgemäß kaum Homologien mit den Stämmen von Gruppe I.

Die Tatsache, daß in keinem Fall eine DNA-DNA-Homologie von über 70 % auftrat, führt zu der Schlußfolgerung, daß zu keiner bekannten *Lactobacillus*-Art eine enge Verwandtschaft vorliegt, und die Stämme der Gruppe I daher als Vertreter einer neuen Species angesehen werden müssen.

Der Name *L.lindneri* wird vorgeschlagen, da diese Stämme sowohl in ihrem Biotop (Bier) als auch in ihren phänotypischen Eigenschaften (Zuckerspektrum) mit Isolaten übereinstimmen, die Henneberg 1901 als *Bacillus lindneri* bezeichnet hatte und die später als *Lactobacillus lindneri* (Bergey et al., 1923), *Bacterium lindneri* (Henneberg, 1926) und *Lactobacterium lindneri* (Krasil'nicov, 1949) beschrieben wurden.

Tab. 15: % DNA-DNA-Homologien (Renaturierungsmethode) zwischen den Vertretern der Gruppen I und 2 und Referenzstämmen anderer Arten

Stamm	IX 9a	IX 9b	IX 7a	IX 6a	IX 5g	IXA3a	IX 2b	KPA
IX 9a	/	104	61	54	63			
IX 9b	104	/		37				
IX 7a	61			107	112	104	104	104
IX 6a	54	37	107	/	102		107	
IX 5g	63		112	102	/			
IX 7g			102		105			
IXA 1b			100					
IX 8h	47					99		
IXA 3a			104			/		
IX 2b			104	107			/	
IX 10g			98				103	
KPA			104					
<i>L. fructivorans</i> 20203	32		48					
<i>L. malefermentans</i> 11306	52		53		55			46
<i>L. reuteri</i> 20016	33		57		58			
<i>L. hilgardii</i> 20176								41
<i>L. buchneri</i> 20057								36
<i>L. frigidus</i> 20173								28
<i>L. brevis</i> 20054	24	17						

Bei den von Eschenbecher 1968 als *L.brevis* var. *lindneri* bezeichneten Bierisolaten dürfte es sich um Vertreter derselben Art handeln.

Dagegen sind die von Spicher und Schröder (1978) mit dem gleichen Namen versehenen Sauerteigisolate, wie die DNA-DNA-Homologiestudien (Tab. 13) gezeigt haben, Vertreter von *L.sanfrancisco*.

Beschreibung der Art *L.lindneri*:

Lactobacillus lindneri sp.nov.nom.rev.

(*lindneri*. M.L.gen.n. *lindneri* von Lindner, benannt nach dem deutschen Mikrobiologen)

Gram-positive, nicht sporenbildende Stäbchen von unregelmäßiger Gestalt, oft nahezu kokkoid (0,9 - 1,2 μ m), zum Teil aber auch sehr lange Filamente bildend (2 - 5 μ m und länger), einzeln oder in kurzen Ketten. Nicht beweglich.

Mikroaerophil. Leicht acidophil (günstiger Anfangs-pH-Wert für Wachstum: 5,4). Wachstum zwischen 15° und 35°C mit einem Optimum bei ca. 25°C.

Heterofermentativ; CO₂, Essigsäure (Äthanol) und DL-Milchsäure aus Hexosen. Nur Glucose, Fructose und Maltose werden vergoren; keine Vergärung von Arabinose, Cellobiose, Lactose, Mannit, Melezitose, Raffinose, Rhamnose, Ribose, Saccharose, Salicin, Sorbit, Trehalose und Xylose. Keine Freisetzung von Ammoniak aus Arginin. Keine CO₂-Bildung aus Gluconat. Katalase-negativ.

Elektrophoretische Beweglichkeit von L-LDH und D-LDH sind 1,14 bzw. 1,60 (Kaninchen-L-LDH iso I = 1,0).

Zellwand enthält Murein des Lys-Asp-Typs und keine Teichonsäuren.

G+C-Gehalt der DNA: 34 - 36 mol% (Tm).

Habitat: isoliert aus Bier.

Typstamm: KPA = DSM 20690.

Gruppe 2:

Zwischen den Stämmen IX 9a und IX 9b besteht eine sehr hohe DNA-DNA-Homologie (104 %) (Tab. 15). Mit den Vertretern von Gruppe 1 ergaben sich zwar auch relativ hohe Homologiewerte (bis zu 63 %), sie sind jedoch deutlich niedriger als diejenigen, die die Stämme der 1. Gruppe untereinander aufweisen (98 - 112 %). Eine Zuordnung der Stämme IX 9a und IX 9b zu Gruppe 1 ist also nicht möglich. Auch mit den anderen Betabakterien des gleichen Mureintyps und mit ähnlichem G+C-Gehalt liegt keine enge Verwandtschaft der Gruppe 2 vor, wie die Homologiedaten zeigen, die mit *L.fructivorans* (32 %), *L.malefermentans* (52 %), *L.reuteri* (33 %) und *L.brevis* (24 bzw. 17 %) gefunden wurden. Es handelt sich also um eine mit den Vertretern von Gruppe 1 offenbar relativ eng verwandte, jedoch davon verschiedene Art.

Gruppe 3:

Für DNA-DNA-Hybridisierungen wurden aus der Gruppe 3 nur die Stämme MO 67/2, MO 67/3, MO 67/4 und MO 67/5 ausgewählt (Tab. 16). Sie erwiesen sich als untereinander hoch-homolog (77 - 110 %), und die Hybridisierungen mit Stamm XIA 3d aus Gruppe 4 und mit dem Typstamm von *L.brevis* ergaben ebenfalls sehr hohe Homologiewerte (zwischen 75 und 87 %). Es handelt sich somit eindeutig um Vertreter der Art *L.brevis*. Bemerkenswert sind die relativ hohen Homologien gegenüber Stamm IX 9a und IX 6a (47 - 60 %).

Gruppe 4:

Da sich die Stämme der 4. Gruppe in der elektrophoretischen Beweglichkeit ihrer D-LDH etwas vom Typstamm von *L.brevis* unterschieden, stellte sich die Frage, ob es sich um Vertreter dieser Art oder um nahe Verwandte von *L.brevis* handelt.

Die DNA-DNA-Hybridisierungen (Tab. 17), die eine sehr hohe Homologie sowohl der Stämme untereinander (70 - 103 %), als auch mit dem Typstamm von *L.brevis* (71 - 96 %) ergaben,

zeigen, daß die Stämme von Gruppe 4 trotz der Abweichung in der elektrophoretischen Mobilität ihrer D-LDH zu *L.brevis* gehören.

Tab. 16: % DNA-DNA-Homologien zwischen den Vertretern von Gruppe 3 und anderen Stämmen

Stamm	MO 67/2	MO 67/3	MO 67/4	MO 67/5
MO 67/2		103	105	
MO 67/3	103	/	82	77
MO 67/4	105	82	/	110
MO 67/5		77	110	/
<i>L.brevis</i> 20054	81		75	
XIA 3d		77		87
IX 9a		60	47	54
IX 6a		52		55

Tab. 17: % DNA-DNA-Homologien zwischen den Vertretern der Gruppe 4

Stamm	IXA 3d	XIA 1g	MO 38/2	XI 9f	MO04/2	XIA 1d	IX 10b
XIA 3d	/	84	89	93	99	79	81
XIA 3b	92						
XIA 1g	84	/	84	70	80		81
MO 38/2	89	84	/		78		74
X 8h	103						
XI 9f	93			/	94	82	85
MO04/2	99	80	78	94	/		
XIA 1d	79			82		/	87
IX 10b	81	81	74	85		87	/
<i>L.brevis</i> 20054	71	87		96	88	75	90

Gruppe 5:

Die Stämme IV 9d, X 7g und XIA 2h waren aufgrund der identischen Laufstrecken ihrer LDHs bei der Gelelektrophorese zu einer Gruppe zusammengefaßt worden. Außerdem stimmen sie auch in ihren Zuckervergärungsspektren und im G+C-Gehalt überein. Da die elektrophoretische Beweglichkeit ihrer LDHs der von den LDHs von *L.buchneri* und *L.frigidus* entsprach und daher eine Verwandtschaft zu einer dieser beiden Arten vermutet werden konnte, wurden der Typstamm von *L.buchneri* und *L.frigidus* 20173 in die DNA-DNA-Hybridisierungen dieser Stämme einbezogen (Tab. 18).

Die sehr hohen Homologien der 3 Stämme sowohl untereinander (94 - 108 %) wie auch gegenüber *L.frigidus* (75 - 85 %) erlauben die Schlußfolgerung einer Zugehörigkeit zu der Species *L.frigidus*. Auf der anderen Seite zeigen die niedrigen Homologien mit *L.buchneri* (43 - 45 %), daß sie mit dieser Art zwar verwandt sind, ihr aber nicht angehören.

Tab. 18: % DNA-DNA-Homologien zwischen den Vertretern von Gruppe 5 und je 1 Referenzstamm von *L.frigidus* und *L.buchneri*

Stamm	IV 9d	X 7g	XIA 2h
IV 9d	/	94	108
X 7g	94	/	96
XIA 2h	108	96	/
<i>L.frigidus</i> 20173	84	75	85
<i>L.buchneri</i> 20057	45	43	

VERWANDTSCHAFTSBEZIEHUNGEN ZWISCHEN DEN VERSCHIEDENEN GATTUNGEN DER MILCHSÄUREBAKTERIEN

DNA-rRNA-HYBRIDISIERUNGEN

Die niedrigen DNA-DNA-Homologien zwischen den meisten Milchsäurebakterien machen deutlich, daß es sich um eine stammesgeschichtlich alte Bakteriengruppe handelt, die sich sehr stark auseinander entwickelt hat, und daß daher mit dieser Methode ihre genealogische Verwandtschaft nicht erfaßt werden kann. Um dennoch Aufschluß über die verwandtschaftlichen Verhältnisse dieser entfernt verwandten Arten zu gewinnen, wurden DNA-rRNA-Hybridisierungen durchgeführt. Durch den damit möglichen Vergleich der Ähnlichkeit der konservativeren rRNA-Gene sollte es möglich sein, auch die genealogischen Verwandtschaften zwischen Arten festzustellen, die ähnlich weit voneinander entfernt sind wie verschiedene Gattungen.

Anders als bei den DNA-DNA-Hybridisierungen nach der Filtermethode, bei der man aufgrund von Bindungsraten Aussagen über den Homologiegrad der DNA von Organismen machen kann, ist die prozentuale Bindung der RNA an die DNA, die man bei den DNA-rRNA-Hybridisierungen erhält, für die Auswertung nur von sehr begrenztem Wert. Die Bindungsraten sind stark abhängig von der Genomgröße, dem Replikationszustand der DNA und der Anzahl der rRNA-Cistrone (de Smedt und de Ley, 1977), die zwischen 3 und 10 betragen kann (Bendich und McCarthy, 1970). Deshalb wurde auf die Darstellung der Hybridisierungsergebnisse in Form der von de Smedt und de Ley (1977) entwickelten und von den meisten Autoren übernommenen Ähnlichkeitsdiagramme, bei denen die prozentuale Bindung gegen den Schmelzpunkt ($T_{m(e)}$) aufgetragen wird, verzichtet. Stattdessen wurden nur die $\Delta T_{m(e)}$ -Werte (Differenz zum $T_{m(e)}$ des homologen DNA-RNA-Hybrids) als Grundlage der Ähnlichkeitsdiagramme verwendet.

3.1.1

$\Delta Tm_{(e)}$ -Werte

Die DNA-rRNA-Hybridisierungen wurden mit Vertretern aller 4 Gattungen der Milchsäurebakterien durchgeführt. Die 3H -markierte 23S rRNA der Typstämme von *L.viridescens*, *Lc.paramesenteroides*, *Lc.mesenteroides*, *L.buchneri*, *L.fermentum*, *L.casei*, *L.plantarum* und *L.gasseri* wurde mit der filtergebundenen DNA von Laktobazillen, Pediokokken, Streptokokken und Vertretern von *Leuconostoc* hybridisiert. Außerdem wurde DNA von *E.coli* B als Stamm, der zu Milchsäurebakterien mit Sicherheit nur eine sehr entfernte Verwandtschaft aufweist, als "externer Standard" eingesetzt.

Die gefundenen Bindungsraten (angegeben in μg gebundene RNA pro 100 μg DNA), sowie die $Tm_{(e)}$ - und $\Delta Tm_{(e)}$ -Werte sind in den Tabellen 19 - 26 zusammengefaßt. Falls Daten aus mehreren verschiedenen Hybridisierungsansätzen vorlagen, wurden diese in getrennten, mit römischen Zahlen versehenen Spalten dargestellt.

Bei den in die Hybridisierungen eingesetzten Stämmen handelte es sich in der Regel um die Typstämme der Arten. Nur im Falle von *L.acidophilus* und *L.curvatus* wurde jeweils ein anderer, nach Lauer et al. (1980) bzw. Dellaglio et al. (1975) jedoch mit dem Typstamm der betreffenden Art (20079 bzw. 20019) hoch-homologer Stamm (4913 bzw. 20010) verwendet, und von *Ped.acidilactici* wurde, da der Typstamm dieser Art nach den Befunden der DNA-DNA-Homologiestudien von Back und Stackebrandt (1978) zu *Ped.pentosaceus* gehört, ein anderer Vertreter der Homologiegruppe von *Ped.acidilactici* (20248) eingesetzt.

- 1) Hybridisierungen mit 3H -RNA von *L.viridescens* 20410 (Tab. 19):

Erwartungsgemäß ergab sich für die homologe Paarung von *L.viridescens* der höchste Schmelzpunkt $Tm_{(e)}$ (77,8°C) und für *E.coli*B als am weitesten entfernte Art der niedrigste Wert (66,5°C).

Sehr geringe Unterschiede zum $T_{m(e)}$ von *L.viridescens* wurden für *L.minor*, *L.confusus*, *L.halotolerans* und *Lc.paramesenteroides* gefunden (1,3 - 2,9), was auf eine enge Verwandtschaft dieser Arten hindeutet und mit den Ergebnissen der DNA-DNA-Hybridisierungen (15 - 30 % Homologien) in Einklang steht. Auf der anderen Seite weisen die *Leuconostoc*-Arten und die übrigen Betabakterien deutlich höhere Differenzen zum $T_{m(e)}$ der homologen Paarung auf (Werte zwischen 4,6 und 7,7). Für die homofermentativen Laktobazillen *L.ruminis* und *L.delbrueckii* ergaben sich noch etwas höhere $\Delta T_{m(e)}$ -Werte (8,1 bzw. 8,8). Auffällig ist der große Abstand von *Lc.oenos* ($\Delta T_{m(e)} = 9,7$).

Tab. 19: DNA-rRNA-Hybridisierungen mit 3H -RNA von *L.viridescens* DSM 20410

Species	Stamm	%Bindung	$T_{m(e)}$	$\Delta T_{m(e)}$
<i>L.viridescens</i>	20410	0,145	77,8	
<i>L.minor</i>	20014	0,143	76,5	1,3
<i>L.confusus</i>	20196	0,109	75,2	2,6
<i>L.halotolerans</i>	20190	0,126	75,2	2,6
<i>Lc.paramesenteroides</i>	20288	0,08	74,9	2,9
<i>L.kandleri</i>	20593	0,07	73,2	4,6
<i>L.fermentum</i>	20052	0,084	72,7	5,1
<i>L.buchneri</i>	20057	0,047	71,8	6,0
<i>Lc.spec.</i>	20193	0,054	71,7	6,1
<i>Lc.amelibiosum</i>	20188	0,111	71,4	6,4
<i>Lc.lactis</i>	20202	0,081	70,9	6,9
<i>L.bifermentans</i>	20003	0,033	70,4	7,4
<i>Lc.mesenteroides</i>	20343	0,044	70,4	7,4
<i>L.brevis</i>	20054	0,05	70,1	7,7
<i>L.ruminis</i>	20403	0,057	69,7	8,1
<i>L.delbrueckii</i>	20074	0,053	69,0	8,8
<i>Lc.oenos</i>	20252	0,027	68,1	9,7
<i>E.coli</i>	B	0,013	66,5	11,3

Tab. 20: DNA-rRNA-Hybridisierungen mit ^3H -RNA von *Lc.paramesenteroides* DSM 20288

Species	Stamm	%Bindung	I	II	III	$\Delta T_m(e)$
			$T_m(e)$	$T_m(e)$	$T_m(e)$	
<i>Lc.paramesenteroides</i>	20288	0,18	77,1	76,1	78,7	
<i>L.minor</i>	20014	0,2	75,3			1,8
<i>L.confusus</i>	20496	0,27	75,0			2,1
<i>L.halotolerans</i>	20190	0,2	74,8			2,3
<i>L.viridescens</i>	20410	0,227	74,6			2,5
<i>L.kandleri</i>	20593	0,14	73,7			3,4
<i>L.vaccinostercus</i>	20634	0,109			74,3	4,4
<i>L.fermentum</i>	20052	0,127		71,3		4,8
<i>L.alimentarius</i>	20249	0,207		71,2		4,9
<i>L.ruminis</i>	20403	0,107		71,0		5,1
<i>L.buchneri</i>	20057		70,3		5,8	
<i>Ped.acidilactici</i>	20284	0,23			72,3	6,4
<i>Lc.amelibiosum</i>	20188	0,16	70,3			6,8
<i>L.fructivorans</i>	20203	0,147	70,0			7,1
<i>Lc.spec.</i>	20189	0,12	69,9			7,2
<i>Ped. damnosus</i>	20331	0,08			71,2	7,5
<i>Lc.lactis</i>	20202	0,18	69,5			7,6
<i>Lc.spec.</i>	20193	0,133	69,5			7,6
<i>L.plantarum</i>	20174	0,036			70,9	7,8
<i>L.bifermentans</i>	20003	0,05	68,7			8,4
<i>Ent.faecalis</i>	20478	0,019			70,2	8,5
<i>L.delbrueckii</i>	20074	0,068		67,5		8,6
<i>Lc.mesenteroides</i>	20343	0,09	68,3			8,8
<i>L.casei</i>	20011	0,08			69,4	9,3
<i>L.fructosus</i>	20349	0,095			69,0	9,7
<i>L.sanfrancisco</i>	20451	0,234			68,8	9,9
<i>E.coli</i>	8	0,027		65,8		10,3
<i>Lc.oenos</i>	20252	0,06	66,6			10,5
<i>S.bovis</i>	20480	0,09			67,0	11,7
<i>L.acidophilus</i>	4913	0,15			66,7	12,0
<i>S.lactis</i>	20481	0,089			65,5	13,2

Tab. 21: DNA-rRNA-Hybridisierungen mit ^3H -RNA von
Lc.mesenteroides DSM 20343

Species	Stamm	%Bindung	T _m (e)	ΔT _m (e)
Lc.mesenteroides	20343	0,14	76,0	
Lc.spec.	20193	0,16	76,0	0
Lc.lactis	20202	0,213	75,7	0,3
L.fructosus	20349	0,123	75,7	0,3
Lc.amelibiosum	20188	0,207	75,5	0,5
Lc.mesenteroides subsp. cremoris	20346	0,12	75,0	1,0
Lc.spec.	20189	0,147	73,7	1,6
L.plantarum	20174	0,052	72,7	3,4
Lc.paramesenteroides	20288	0,093	71,3	4,7
Ped.damnosus	20331	0,082	70,8	5,2
L.alimentarius	20249	0,147	70,8	5,2
L.viridescens	20410	0,193	70,5	5,5
L.malefermentans	11306	0,063	70,5	5,5
L.collinoides	27612	0,056	70,5	5,5
L.confusus	20196	0,227	70,4	5,6
L.halotolerans	20190	0,153	70,3	5,7
L.fermentum	20052	0,127	70,2	5,8
L.minor	20014	0,14	70,0	6,0
Ped.acidilactici	20284	0,193	70,0	6,0
L.ruminis	20403	0,093	70,0	6,0
L.sanfrancisco	20451	0,126	69,7	6,3
L.kandleri	20593	0,093	69,6	6,4
L.casei	20011	0,093	69,5	6,5
L.acidophilus	4913	0,176	69,5	6,5
L.bifermentans	20003	0,073	69,4	6,6
S.mutans	20523	0,095	69,2	6,8
Ent.faecalis	20478	0,04	69,2	6,8
L.fructivorans	20203	0,133	69,1	6,9
L.divergens	20623	0,037	69,0	7,0
L.vaccinostercus	20634	0,12	69,0	7,0
L.pastorianus	20197	0,065	69,0	7,0
L.buchneri	20057	0,1	68,7	7,3
S.bovis	20480	0,098	68,5	7,5
S.lactis	20481	0,106	68,3	7,7
L.delbrueckii	20074	0,08	67,7	8,3
Lc.oenos	20252	0,027	67,0	9,0
E.coli	B	0,04	63,5	12,5

Tab. 22: DNA-rRNA-Hybridisierungen mit ^3H -RNA von
L.buchneri DSM 20057

Species	%Bindung	I	II	$\Delta T_m(e)$
		$T_m(e)$	$T_m(e)$	
L.buchneri	0,14	75,0	75,1	
L.kefir	0,164	75,0		0
L.hilgardii	0,091	74,2		0,8
L.frigidus	0,073	73,0		2,0
L.collinoides	0,04		72,5	2,6
Ped.damnosus	0,077		72,0	3,1
L.brevis	0,089	71,8		3,2
L.plantarum	0,066		71,7	3,4
L.fructivorans	0,146	70,7		4,3
L.lindneri	0,164		70,8	4,3
L.casei	0,098		70,6	4,5
L.pastorianus	0,071		70,3	4,8
L.fermentum	0,119	70,1		4,9
L.sanfrancisco	0,239	70,1		4,9
L.malefermentans	0,048	70,0		5,0
L.ruminis	0,103	70,0		5,0
Ped.acidilactici	0,199	70,0		5,0
L.divergens	0,052		70,0	5,1
L.bifermentans	0,073	69,8		5,2
L.alimentarius	0,162	69,7		5,3
Ent.faecalis	0,062	69,7		5,3
L.vaccinostercus	0,109	69,3		5,7
L.reuteri	0,145	69,0		6,0
L.viridescens	0,143	68,6		6,4
Lc.paramesenteroides	0,061	68,1		6,9
L.fructosus	0,084		68,1	7,0
Lc.oenos	0,043	67,2		7,8
L.delbrueckii	0,078	66,9		8,1
Lc.lactis	0,123		66,9	8,2
L.acidophilus	0,105		66,7	8,4
S.mutans	0,081		66,5	8,6
S.bovis	0,089		66,3	8,8
Lc.mesenteroides	0,023	65,8		9,2
S.lactis	0,101		65,2	9,9
E.coli	0,022	64,8		10,2
L.vitulinus	0,141		64,1	11,0

Tab. 23: DNA-rRNA-Hybridisierungen mit ^3H -RNA von *L. fermentum* DSM 20052

Species	%Bindung	I	II	$\Delta T_m(e)$
		$T_m(e)$	$T_m(e)$	
<i>L. fermentum</i>	0,37	77,3	79,4	
<i>L. reuteri</i>	0,267	74,8		2,5
<i>Ped. acidilactici</i>	0,313	73,8		3,5
<i>L. vaccinostercus</i>	0,173	73,1		4,2
<i>L. ruminis</i>	0,033	71,5		5,8
<i>L. collinoides</i>	0,057	70,9		6,4
<i>L. plantarum</i>	0,093		73,0	6,4
<i>L. alimentarius</i>	0,217	70,7		6,6
<i>L. buchneri</i>	0,18	70,5		6,8
<i>L. divergens</i>	0,12		72,6	6,8
<i>L. viridescens</i>	0,227	70,3		7,0
<i>L. sanfrancisco</i>	0,34	70,1		7,2
<i>Lc. paramesenteroides</i>	0,107	70,0		7,3
<i>L. bifermentans</i>	0,127	69,8		7,5
<i>Lc. lactis</i>	0,2	69,6		7,7
<i>L. fructivorans</i>	0,253		71,7	7,7
<i>L. brevis</i>	0,16		71,3	8,1
<i>L. casei</i>	0,207		71,2	8,2
<i>Ent. faecalis</i>	0,079	68,9		8,4
<i>L. fructosus</i>	0,16		70,5	8,9
<i>L. malefermentans</i>	0,12		70,2	9,2
<i>L. delbrueckii</i>	0,107	67,5		9,8
<i>Lc. oenos</i>	0,073	67,5		9,8
<i>E. coli</i>	0,043	66,5		10,8
<i>L. acidophilus</i>	0,287		68,5	10,9
<i>S. mutans</i>	0,173		67,4	12,0
<i>S. bovis</i>	0,16		67,0	12,4
<i>S. lactis</i>	0,193		66,7	12,7

Tab. 24: DNA-rRNA-Hybridisierungen mit ^3H -RNA von
L.casei DSM 20011

Species	%Bindung	I	II	$\Delta T_m(e)$
		$T_m(e)$	$T_m(e)$	
L.casei subsp. casei	0,12	80,6	80,2	0
L.casei subsp. alactosus	0,093	80,0		0,6
L.casei subsp. rhamnosus	0,087	79,8		0,8
L.bifermentans	0,113		74,8	5,4
L.sharpeae	0,08	75,0		5,6
L.coryniformis	0,066	74,6		6,0
Ped.acidilactici	0,104		74,2	6,0
L.curvatus	0,12	73,8		6,8
Ped.damnosus	0,067		73,3	6,9
L.plantarum	0,05	73,3		7,3
L.murinus	0,047		72,8	7,4
L.buchneri	0,093		72,8	7,4
L.yamanashiensis	0,087	73,1		7,5
L.vaccinostercus	0,093		72,4	7,8
L.fructivorans	0,115	72,6		8,0
L.alimentarius	0,073	72,5		8,1
L.animalis	0,08	72,5		8,1
Ent.faecalis	0,033		71,9	8,3
L.agilis	0,147	71,8		8,8
L.ruminis	0,053		71,3	8,9
L.amylovorus	0,04		71,2	9,0
L.viridescens	-		70,9	9,3
L.salivarius	0,06		70,8	9,4
Lc.paramesenteroides	0,07		70,8	9,4
L.amylophilus	0,073		70,7	9,5
L.maltaromicus	0,019	70,8		9,8
L.sanfrancisco	0,1	70,6		10,0
L.fermentum	0,127		70,0	10,2
S.sanguis	0,06		70,0	10,2
L.jensenii	0,067	70,0		10,6
L.delbrueckii	0,08		69,4	10,8
L.gasseri	0,08	69,7		10,9
L.fructosus	0,08	69,5		11,1
Lc.lactis	0,14	69,2		11,4
S.bovis	0,067		68,6	11,6
L.acidophilus	0,113	68,6		12,0
S.mutans	0,065	68,0		12,6
S.lactis	0,083	68,0		12,6
Lc.oenos	0,04		66,8	13,4
L.vitulinus	0,1	65,2		15,4
E.coli	0,024	62,3		18,3

Tab. 25: DNA-rRNA-Hybridisierungen mit ^3H -RNA von *L. plantarum* DSM 20174

Species	%Bindung	I $T_m(e)$	II $T_m(e)$	$\Delta T_m(e)$
<i>L. plantarum</i>	0,093	76,6	76,2	
<i>Ped. acidilactici</i>	0,233		74,0	2,2
<i>L. vaccinostercus</i>	0,12	73,7		2,9
<i>L. yamanashiensis</i>	0,12	73,2		3,4
<i>L. fermentum</i>	0,144		72,5	3,7
<i>L. bifermentans</i>	0,097		72,3	3,9
<i>L. buchneri</i>	0,12		72,2	4,0
<i>L. coryniformis</i>	0,077		71,7	4,5
<i>L. ruminis</i>	0,034	72,0		4,6
<i>L. sharpeae</i>	0,113	71,7		4,9
<i>L. alimentarius</i>	0,127		71,3	4,9
<i>Ped. damnosus</i>	0,06		71,2	5,0
<i>L. animalis</i>	0,113		71,0	5,2
<i>L. agilis</i>	0,187		70,8	5,4
<i>L. casei</i>	0,087		70,7	5,5
<i>L. murinus</i>	0,057		70,7	5,5
<i>L. divergens</i>	0,037		70,6	5,6
<i>L. curvatus</i>	0,157		70,5	5,7
<i>L. sanfrancisco</i>	0,275		70,5	5,7
<i>Lc. paramesenteroides</i>	0,103		70,2	6,0
<i>L. maltaromicus</i>	0,062	70,5		6,1
<i>L. amylovorus</i>	0,045		70,0	6,2
<i>L. viridescens</i>	0,187		69,7	6,5
<i>L. amylophilus</i>	0,1		69,6	6,6
<i>Ent. faecalis</i>	0,093	69,9		6,7
<i>L. delbrueckii</i>	0,118		69,3	6,9
<i>L. jensenii</i>	0,072		69,1	7,1
<i>L. salivarius</i>	0,073		69,1	7,1
<i>L. fructosus</i>	0,079		69,0	7,2
<i>Lc. lactis</i>	0,153		67,7	8,5
<i>L. acidophilus</i>	0,141		67,5	8,7
<i>S. mutans</i>	0,083		67,5	8,7
<i>S. bovis</i>	0,087		67,3	8,9
<i>S. lactis</i>	0,087		67,2	9,0
<i>L. gasseri</i>	0,107		66,7	9,5
<i>Lc. oenos</i>	0,038		66,4	9,8
<i>L. vitulinus</i>	0,167	66,3		10,3
<i>E. coli</i>	0,039	64,1		12,5

Tab. 26: DNA-rRNA-Hybridisierungen mit ^3H -RNA von *L.gasseri* DSM 20243

Species	%Bindung	I $T_m(e)$	II $T_m(e)$	$\Delta T_m(e)$
<i>L.gasseri</i>	0,184	77,0	77,1	
<i>L.jensenii</i>	0,098	73,6		3,4
<i>L.acidophilus</i>	0,187	71,8		5,2
<i>L.alimentarius</i>	0,127		71,6	5,5
<i>L.amylophilus</i>	0,087		71,5	5,6
<i>L.delbrueckii</i>	0,1	70,8		6,2
<i>L.amylovorus</i>	0,051	70,8		6,2
<i>Ped.acidilactici</i>	0,16		70,7	6,4
<i>L.agilis</i>	0,16		70,6	6,5
<i>L.casei</i>	0,07		70,4	6,7
<i>L.coryniformis</i>	0,06		70,2	6,9
<i>L.ruminis</i>	0,135		70,0	7,1
<i>Ped.damnosus</i>	0,018		70,0	7,1
<i>L.vaccinostercus</i>	0,087		69,9	7,2
<i>L.animalis</i>	0,07		69,8	7,3
<i>L.yamanashiensis</i>	0,068		69,8	7,3
<i>L.sharpeae</i>	0,073		69,7	7,4
<i>L.plantarum</i>	0,047		69,5	7,6
<i>L.fermentum</i>	0,073		69,5	7,6
<i>L.bifermentans</i>	0,06		69,5	7,6
<i>Ent.faecalis</i>	0,027	69,4		7,6
<i>L.fructosus</i>	0,061		69,2	7,9
<i>L.salivarius</i>	0,073	69,1		7,9
<i>L.curvatus</i>	0,113		68,8	8,3
<i>L.buchneri</i>	0,073		68,8	8,3
<i>L.maltaromicus</i>	0,044		68,7	8,4
<i>L.viridescens</i>	0,133		68,5	8,6
<i>L.murinus</i>	0,04		68,4	8,7
<i>Lc.paramesenteroides</i>	0,067		68,3	8,8
<i>Lc.lactis</i>	0,117		67,8	9,3
<i>S.mutans</i>	0,08		67,8	9,3
<i>S.lactis</i>	0,067		67,8	9,3
<i>S.bovis</i>	0,07		67,5	9,6
<i>L.sanfrancisco</i>	0,193		67,1	10,0
<i>Lc.oenos</i>	0,03		65,4	11,7
<i>L.vitulinus</i>	0,14	64,3		12,7
<i>E.coli</i>	0,036	63,7		13,3

2) Hybridisierungen mit ^3H -RNA von Lc.paramesenteroides 20288 (Tab. 20)

Die niedrigsten $\Delta T_{m(e)}$ -Werte (1,8 - 3,4) gegenüber Lc.paramesenteroides ergaben nicht die Hybridisierungen mit den übrigen Leuconostoc-Arten, sondern die L.viridescens nahe-stehenden heterofermentativen Laktobazillen (neben L.viridescens: L.minor, L.confusus, L.halotolerans und L.kandleri). Mit den Vertretern von Leuconostoc weist Lc.paramesenteroides wesentlich höhere $\Delta T_{m(e)}$ -Werte (6,8 - 10,5) auf. Die schon aufgrund der Ergebnisse der DNA-DNA-Hybridisierungen vermutete engere Verwandtschaft von Lc.paramesenteroides zu den Betabakterien wird damit bestätigt. Es wurden sogar für verschiedene homo- und heterofermentative Laktobazillen (L.vaccinostercus, L.fermentum, L.alimentarius, L.ruminis und L.buchneri) und für Ped.acidilactici ein geringerer $\Delta T_{m(e)}$ -Wert ermittelt als für die Leuconostoc-Arten, von denen wiederum Lc.oenos den größten $\Delta T_{m(e)}$ -Wert (10,5) aufweist. Die sehr hohen $\Delta T_{m(e)}$ -Werte (11,7 - 13,2) gegenüber S.bovis, S.lactis und L.acidophilus, die sogar noch über den mit E.coli B erhaltenen Wert von 10,3 hinausgehen, zeigen, daß $\Delta T_{m(e)}$ -Werte > 10 in den Unschärfbereich der Methode fallen und nicht mehr aussagekräftig sind.

3) Hybridisierungen mit ^3H -RNA von Lc.mesenteroides 20343 (Tab. 21):

Die enge Verwandtschaft der meisten Leuconostoc-Arten untereinander wird bei den Hybridisierungen mit ^3H -RNA von Lc.mesenteroides sehr deutlich. Für die entstehenden Hybride sämtlicher Vertreter dieser Gattung mit Ausnahme von Lc.paramesenteroides und Lc.oenos und überraschenderweise auch für die von L.fructosus ergaben sich fast die gleichen Schmelzpunkte wie für die homologe Paarung von Lc.mesenteroides ($\Delta T_{m(e)} = 0-1,6$). Zu sehr viel höheren $\Delta T_{m(e)}$ -Werten (4,7 - 9,0) führten dagegen die Hybridisierungen mit Lc.paramesenteroides und Lc.oenos.

Nach den $\Delta Tm_{(e)}$ -Werten sind die Betabakterien, die den Leuconostoc-Arten in der Zusammensetzung der Interpeptidbrücke des Mureins ähneln (*L.viridescens*, *L.confusus*, *L.halotolerans*, *L.minor*, *L.kandleri* und *L.sanfrancisco*) mit *Lc.mesenteroides* nicht enger verwandt als andere Laktobazillen wie z. B. *L.plantarum*, *L.malefermentans* und *L.colli-noides* oder die Pediokokken.

Ausschließlich hohe $\Delta Tm_{(e)}$ -Werte (6,8 - 7,7) wurden wiederum mit den Streptokokken erhalten.

4) Hybridisierungen mit 3H -RNA von *L.buchneri* 20057 (Tab. 22):

Einen mit der homologen Paarung nahezu identischen Schmelzpunkt ergab die Hybridisierung von 3H -RNA von *L.buchneri* mit DNA von *L.kefir* und *L.hilgardii* ($\Delta Tm_{(e)} = 0 - 0,8$). Die daraus resultierende hohe Verwandtschaft dieser 3 Arten war bei den DNA-DNA-Hybridisierungen nicht zum Ausdruck gekommen. Eine Reihe weiterer Betabakterien weist gegenüber *L.buchneri* relativ niedrige $\Delta Tm_{(e)}$ -Werte auf: *L.frigidus* (2,0), *L.collinoides* (2,6), *L.brevis* (3,2), *L.fructivorans* (4,3), *L.lindneri* (4,3) und *L.pastorianus* (4,8). Zu dieser Gruppe mit *L.buchneri* verwandter Arten gehören auch *Ped.damnosus* ($\Delta Tm_{(e)} = 3,1$) und die homofermentativen Laktobazillen *L.plantarum* ($\Delta Tm_{(e)} = 3,4$) und *L.casei* ($\Delta Tm_{(e)} = 4,5$).

Die Leuconostoc-Arten und Streptokokken sind dagegen mit *L.buchneri* kaum verwandt, wie die großen $\Delta Tm_{(e)}$ -Werte (6,9 - 9,9) zeigen.

Der höchste $\Delta Tm_{(e)}$ -Wert (11,0) ergab sich für *L.vitulinus*.

5) Hybridisierungen mit 3H -RNA von *L.fermentum* 20052 (Tab. 23):

Bei der Hybridisierung von 3H -RNA von *L.fermentum* mit DNA von *L.reuteri* ergab sich trotz des großen Unterschieds im

G+C-Gehalt ein $\Delta Tm_{(e)}$ -Wert von nur 2,5. Gegenüber *Ped.acidilactici* weist *L.fermentum* einen ähnlich niedrigen $\Delta Tm_{(e)}$ -Wert (3,5) auf. Die meisten übrigen Milchsäurebakterien sind jedoch mit *L.fermentum* nur wenig verwandt. *L.fermentum* steht mit seinem hohen G+C-Gehalt und dem Orn-Asp-Mureintyp innerhalb der Laktobazillen etwas isoliert.

Die größten $\Delta Tm_{(e)}$ -Werte (12,0 - 12,7) ergaben sich mit den Streptokokken.

6) Hybridisierungen mit 3H -RNA von *L.casei* 20011 (Tab. 24):

Mit der 3H -RNA von *L.casei* ergab sich für *E.coli* B ein ungewöhnlich hoher $\Delta Tm_{(e)}$ -Wert (18,3). Zur Überprüfung dieses Ergebnisses wurden die Hybridisierungen mit einer neuen Charge von 3H -RNA von *L.casei* 20011 wiederholt, was zu dem gleichen Resultat führte.

Die DNA-rRNA-Hybride von *L.casei* subsp.*alactosus* und *L.casei* subsp.*rhamnosus* stimmen in ihrem Schmelzpunkt mit der homologen Paarung des Typstamms von *L.casei* überein ($\Delta Tm_{(e)} \leq 0,8$), was die sehr enge Verwandtschaft dieser Unterarten bestätigt. Für keine andere *Lactobacillus*-Art wurde gegenüber *L.casei* ein geringerer $\Delta Tm_{(e)}$ -Wert als 5 gefunden, was auf eine etwas isolierte Stellung dieser Art hindeutet. *L.bifermentans* erwies sich mit einem $\Delta Tm_{(e)}$ -Wert von 5,4 als der nächste Verwandte von *L.casei*.

Die Laktobazillen mit aktivierbarer LDH: *L.sharpeae* und *L.curvatus* zeigen eine gewisse Ähnlichkeit mit *L.casei* ($\Delta Tm_{(e)} = 5,6$ bzw. 6,8), ebenso wie die Pediokokken ($\Delta Tm_{(e)} = 6,0$ bzw. 6,9). Dagegen weisen die Streptococcus- und Leuconostoc-Arten gegenüber *L.casei* sehr hohe $\Delta Tm_{(e)}$ -Werte (zwischen 9,4 und 13,4) auf, was für eine nur geringe Verwandtschaft dieser beiden Gattungen zu *L.casei* spricht. Sehr groß ist auch der Abstand von *L.casei* zu den typischen Thermobakterien *L.jensenii*, *L.delbrueckii*, *L.gasseri*, *L.acidophilus* und besonders zu *L.vitulinus* ($\Delta Tm_{(e)}$ -Werte zwischen 10,6 und 15,4).

7) Hybridisierungen mit ^3H -RNA von L.plantarum 20174 (Tab. 25):

Mit der ^3H -RNA von L.plantarum ergab überraschenderweise eine *Pediococcus*-Art (*Ped.acidilactici*) den geringsten $\Delta\text{Tm}_{(e)}$ -Wert (2,2). Auch *L.vaccinostercus*, *L.yamanashiensis* und *L.fermentum* weisen niedrige $\Delta\text{Tm}_{(e)}$ -Werte (2,9 - 3,7) gegenüber L.plantarum auf, was für eine Verwandtschaft von L.plantarum nicht nur zu homofermentativen, sondern auch zu heterofermentativen *Lactobacillus*-Arten spricht. Nach den $\Delta\text{Tm}_{(e)}$ -Werten sind z. B. homofermentative Arten wie *L.salivarius* und *L.amylophilus* mit L.plantarum weniger verwandt als z. B. die Betabakterien *L.buchneri* und *L.fermentum*. Die größten $\Delta\text{Tm}_{(e)}$ -Werte (6,9 - 10,3) wurden wiederum gegenüber *Leuconostoc*-Arten, Streptokokken und Thermobakterien ermittelt.

8) Hybridisierungen mit ^3H -RNA von L.gasseri 20243 (Tab. 26):

Mit der ^3H -RNA von L.gasseri ergab sich der geringste $\Delta\text{Tm}_{(e)}$ -Wert (3,4) für *L.jensenii*. Etwas entfernter verwandt mit L.gasseri ist *L.acidophilus* ($\Delta\text{Tm}_{(e)} = 5,2$).

Die "klassischen" Streptobakterien *L.casei*, *L.coryniformis*, *L.plantarum* und *L.curvatus* weisen hohe $\Delta\text{Tm}_{(e)}$ -Werte (6,7 - 8,3) gegenüber L.gasseri auf. Noch höhere $\Delta\text{Tm}_{(e)}$ -Werte (> 9) ergaben sich mit den Vertretern von *Leuconostoc* und *Streptococcus*. Wie bei den Hybridisierungen mit ^3H -RNA von *L.buchneri*, *L.casei* und *L.plantarum* zeigt auch hier *L.vitulinus* den größten Abstand zum Schmelzpunkt der homologen Paarung ($\Delta\text{Tm}_{(e)} = 12,7$), was für einen nur geringen Verwandtschaftsgrad dieser Art zu den übrigen Laktobazillen spricht.

3.1.2 Ähnlichkeitsdiagramme

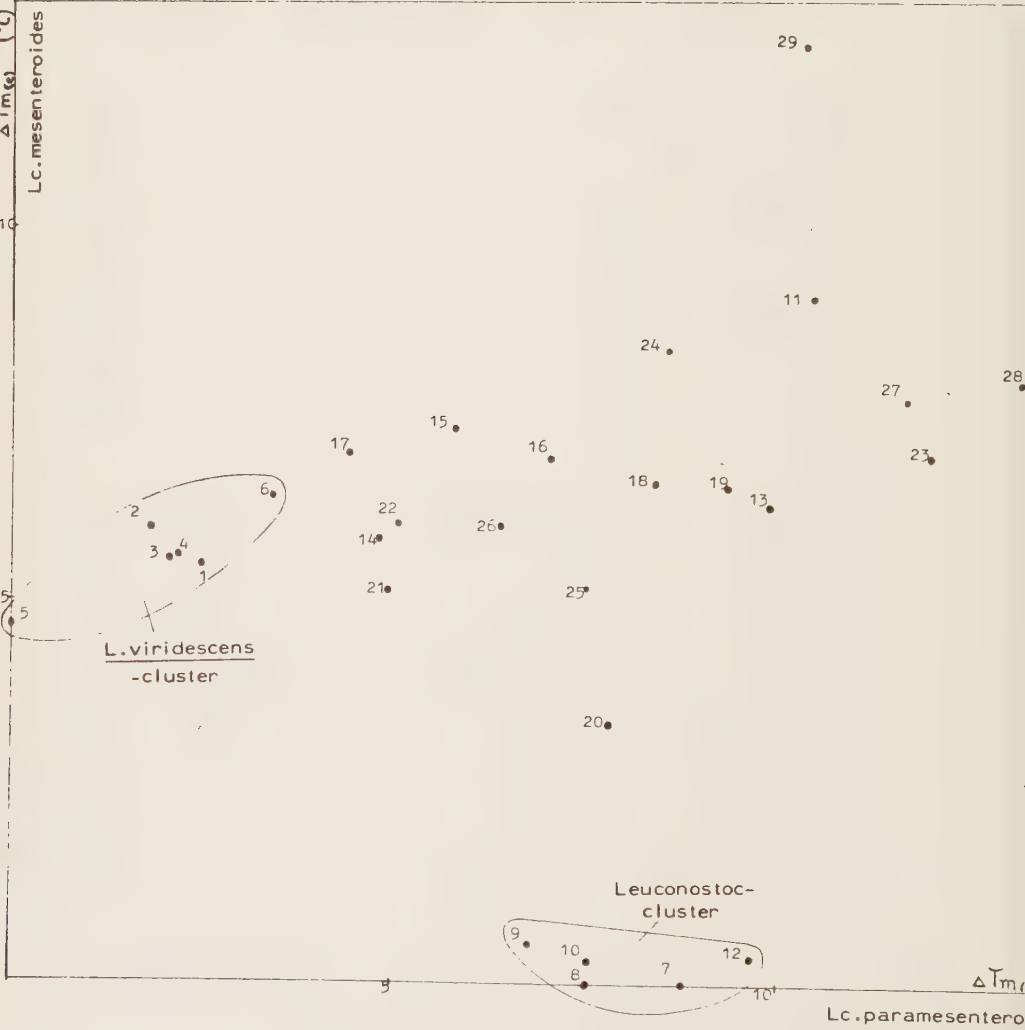
In dem 2-dimensionalen Ähnlichkeitsdiagramm von Abb. 4 sind die $\Delta Tm_{(e)}$ -Werte aus den Hybridisierungen mit 3H -RNA von *Lc.mesenteroides* gegen die von *Lc.paramesenteroides* aufgetragen.

Sehr deutlich wird in dieser Darstellung der Cluster eng verwandter Betabakterien um *L.viridescens* (angedeutet durch das entsprechende Areal) auf der einen Seite und der davon weit entfernte Cluster der *Leuconostoc*-Arten auf der anderen Seite. *Lc.paramesenteroides* gehört dem Cluster um *L.viridescens* an, der sich außerdem aus *L.minor*, *L.halotolerans*, *L.confusus* und *L.kandleri* zusammensetzt. Die isolierte Stellung von *Lc.oenos* und die gegenüber den übrigen Milchsäurebakterien geringe Verwandtschaft der Streptokokken sowie von *L.delbrueckii* und *L.acidophilus* wird ebenfalls deutlich.

In einem 2. Ähnlichkeitsdiagramm wurden die $\Delta Tm_{(e)}$ -Werte aus den Hybridisierungen mit 3H -RNA von *L.casei* und *L.plantarum* gegeneinander aufgetragen (Abb. 5).

Das Bild der Verwandtschaftsverhältnisse ist hier weniger klar und übersichtlich. Weder um *L.casei* noch um *L.plantarum* lassen sich Cluster eng verwandter *Lactobacillus*-Arten bilden. Die Pediokokken scheinen *L.casei* und *L.plantarum* nahezustehen, während die *Leuconostoc*- und *Streptococcus*-Arten, nicht aber *Enterococcus faecalis* von ihnen sehr weit entfernt sind. Die geringste Verwandtschaft mit *L.casei* und *L.plantarum* weist *L.vitulinus* auf.

Abb. 4: Ähnlichkeitsdiagramm der Hybride zwischen 23S rRNA von *Lc.mesenteroides* und von *Lc.paramesenteroides* und DNA verschiedener Milchsäurebakterien.



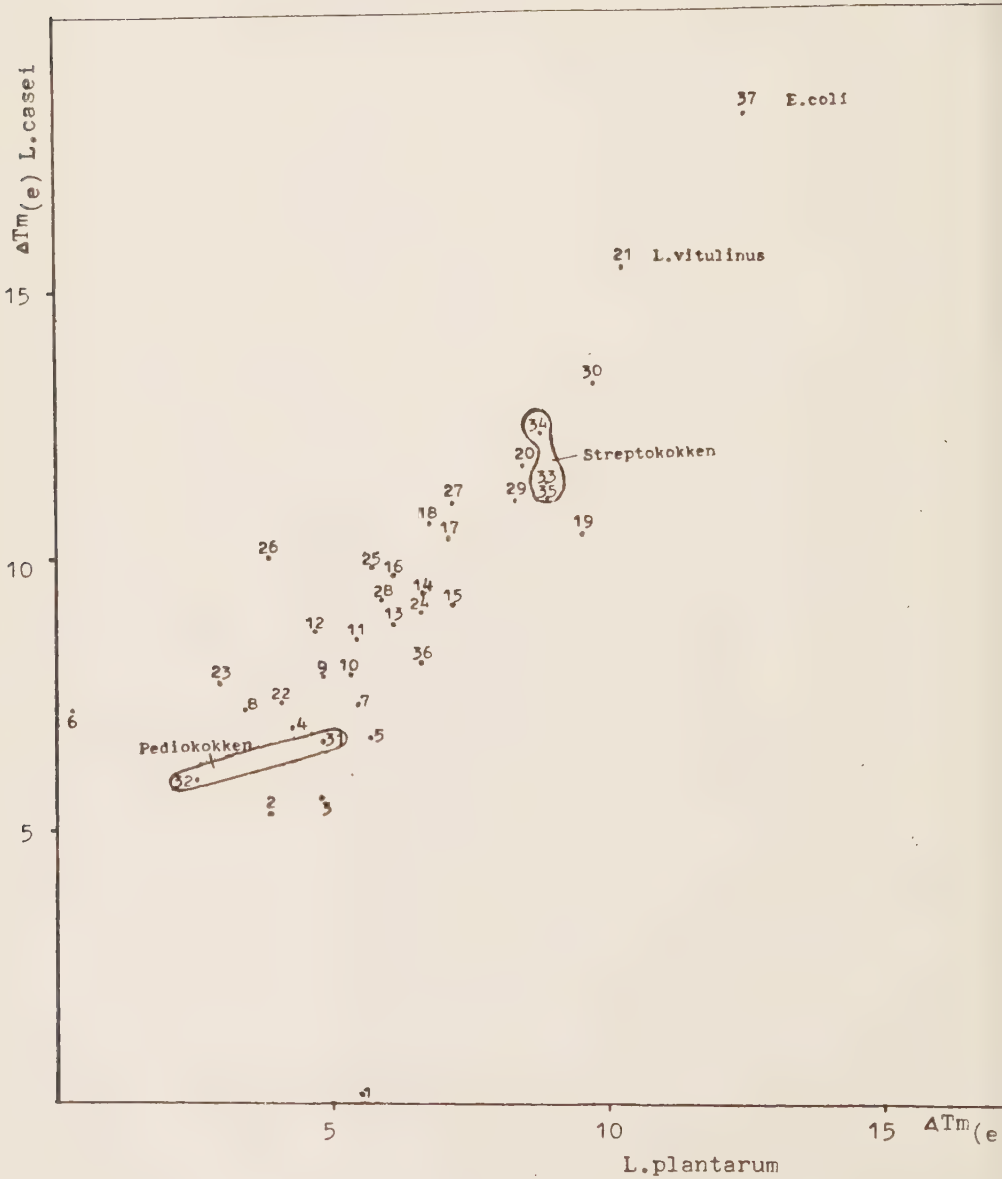
Zu Abb. 4:

1 =	<i>L. viridescens</i>	15 =	<i>L. buchneri</i>
2 =	<i>L. minor</i>	16 =	<i>L. fructivorans</i>
3 =	<i>L. confusus</i>	17 =	<i>L. vaccinostercus</i>
4 =	<i>L. halotolerans</i>	18 =	<i>L. bifermentans</i>
5 =	<i>Lc. paramesenteroides</i>	19 =	<i>L. casei</i>
6 =	<i>L. kandleri</i>	20 =	<i>L. plantarum</i>
7 =	<i>Lc. mesenteroides</i>	21 =	<i>L. alimentarius</i>
8 =	<i>Lc. spec. 20193</i>	22 =	<i>L. ruminis</i>
9 =	<i>Lc. amelibiosum</i>	23 =	<i>L. acidophilus</i>
10 =	<i>Lc. lactis</i>	24 =	<i>L. delbrueckii</i>
11 =	<i>Lc. oenos</i>	25 =	<i>Ped. damnosus</i>
12 =	<i>L. fructosus</i>	26 =	<i>Ped. acidilactici</i>
13 =	<i>L. sanfrancisco</i>	27 =	<i>S. bovis</i>
14 =	<i>L. fermentum</i>	28 =	<i>Ent. faecalis</i>
		29 =	<i>E. coli</i>

Zu Abb. 5:

1 =	<i>L. casei</i>	19 =	<i>L. gasseri</i>
2 =	<i>L. bifermentans</i>	20 =	<i>L. acidophilus</i>
3 =	<i>L. sharpeae</i>	21 =	<i>L. vitulinus</i>
4 =	<i>L. coryniformis</i>	22 =	<i>L. buchneri</i>
5 =	<i>L. curvatus</i>	23 =	<i>L. vaccinostercus</i>
6 =	<i>L. plantarum</i>	24 =	<i>L. viridescens</i>
7 =	<i>L. murinus</i>	25 =	<i>L. sanfrancisco</i>
8 =	<i>L. yamanashiensis</i>	26 =	<i>L. fermentum</i>
9 =	<i>L. alimentarius</i>	27 =	<i>L. fructosus</i>
10 =	<i>L. animalis</i>	28 =	<i>Lc. paramesenteroides</i>
11 =	<i>L. agilis</i>	29 =	<i>Lc. lactis</i>
12 =	<i>L. ruminis</i>	30 =	<i>Lc. oenos</i>
13 =	<i>L. amylovorus</i>	31 =	<i>Ped. damnosus</i>
14 =	<i>L. amylophilus</i>	32 =	<i>Ped. acidilactici</i>
15 =	<i>L. salivarius</i>	33 =	<i>S. bovis</i>
16 =	<i>L. maltaromicus</i>	34 =	<i>S. mutans</i>
17 =	<i>L. jensenii</i>	35 =	<i>S. lactis</i>
18 =	<i>L. delbrueckii</i>	36 =	<i>Ent. faecalis</i>
		37 =	<i>E. coli</i>

Abb. 5: Ähnlichkeitsdiagramm der Hybride zwischen 23S rRNA von *L.casei* und *L.plantarum* und DNA verschiedener Milchsäurebakterien.



1.3 Vernetzungsdiagramme

In den 2-dimensionalen Ähnlichkeitsdiagrammen ergibt sich die Position des jeweils betrachteten Organismus aus den $\Delta Tm_{(e)}$ -Werten der Hybridisierungen mit nur 2 verschiedenen Organismen. Um ein differenzierteres Bild der Verwandtschaftsverhältnisse der Arten zu erhalten, ist aber die gleichzeitige Berücksichtigung sämtlicher jeweils bekannter $\Delta Tm_{(e)}$ -Werte und damit eine mehrdimensionale Darstellung erforderlich.

Daher wurde ein EDV-Programm (Seiler et al., 1977, Ohmayer et al., 1980) dazu benutzt, sogenannte Vernetzungsdiagramme zu errechnen, in denen eine Umsetzung der Positionen der Arten aus dem multidimensionalen Raum in eine Ebene erfolgt ist. Die nach dem Erstellen einer Distanzmatrix unter Anwendung der "Manhattan"-Methode (Sneath und Sokal, 1973) erhaltenen Abstände wurden in dem Computerprogramm so verrechnet (Gradientenmethode nach Sammon, 1969), daß eine Anordnung der Arten im 2-dimensionalen Raum unter Minimierung des Darstellungsfehlers möglich wurde (siehe Seiler et al., 1977).

In der so gewonnenen 2-dimensionalen Darstellung wurden zu vorgegebenen Abstands niveaus die zugehörigen Vernetzungen mit unterschiedlicher Linierung automatisch eingezeichnet. Die kräftigsten Verbindungslinien geben die geringsten Abstände an (0 - 1), die normalen die mittleren (1 - 2) und die gestrichelten die größten Abstände (2 - 3).

Neben den sich bei der Projektion in eine Ebene ergebenden Verzerrungen der Abstände gilt es bei der Interpretation solcher Vernetzungsdiagramme zu beachten, daß die Abstände der Arten kein direktes Maß für ihren Verwandtschaftsgrad darstellen, da die beiden Arten ja nicht direkt miteinander verglichen wurden, sondern nur bezüglich ihres Verhaltens gegenüber verschiedenen

anderen Arten. Ein geringer Abstand zwischen 2 Arten bedeutet nur, daß die beiden Organismen bei den DNA-rRNA-Hybridisierungen sehr ähnliche $\Delta Tm_{(e)}$ -Werte (die sehr hoch, genauso wie auch sehr niedrig sein können) gegenüber der RNA der verschiedenen Arten aufweisen, woraus man aber nicht zwangsläufig folgern kann, daß die beiden Arten auch untereinander sehr ähnlich sein müssen.

Nach den Prinzipien der numerischen Taxonomie kann man jedoch davon ausgehen, daß eine zufällige Gruppierung mit einer steigenden Anzahl von Merkmalen immer unwahrscheinlicher wird, d. h. daß mit der Zahl der in die Hybridisierungen eingesetzten RNAs die Wahrscheinlichkeit dafür zunimmt, daß es sich bei den in den Vernetzungsdiagrammen entstehenden Gruppierungen um genealogische Verwandtschaften handelt.

Das Vernetzungsdiagramm von Abb. 6, das durch die Verrechnung der $\Delta Tm_{(e)}$ -Werte aus den Hybridisierungen der DNA von 22 Stämmen mit der RNA von 7 verschiedenen Arten (*Lc.paramesenteroides*, *Lc.mesenteroides*, *L.buchneri*, *L.fermentum*, *L.casei*, *L.plantarum* und *L.gasseri*) zustandekam, zeigt die komplexen Beziehungen der verschiedenen Vertreter der Milchsäurebakterien.

Die geringsten Abstände ergaben sich zwischen *L.viridescens* und *Lc.paramesenteroides*, zwischen *L.alimentarius*, *L.ruminis* und *L.vaccinostercus* sowie zwischen den *Streptococcus*-Arten.

Während im Falle von *L.viridescens* und *Lc.paramesenteroides* auch die Daten aus den DNA-DNA und DNA-rRNA-Hybridisierungen für eine enge Verwandtschaft dieser 2 Arten sprechen, weisen die Streptokokken *S.lactis*, *S.bovis* und *S.mutans* nach den Befunden der von Garvie und Farrow (1981) und Kilpper-Bälz et al. (1982) durchgeführten DNA-rRNA-Hybridisierungen untereinander eine nur geringe genetische Ähnlichkeit auf. Die benachbarte Position dieser *Streptococcus*-Arten im Vernetzungsdiagramm kommt nur

durch die Gemeinsamkeit der sehr hohen $\Delta Tm_{(e)}$ -Werte gegenüber sämtlichen Referenz-RNAs zustande, d. h. den Streptokokken ist ihre entfernte Verwandtschaft zu den übrigen Milchsäurebakterien gemeinsam, was, wie oben schon gesagt, nicht zwangsläufig bedeuten muß, daß sie auch untereinander eng verwandt sind.

Das 2. Vernetzungsdiagramm (Abb. 7) basiert auf den $\Delta Tm_{(e)}$ -Werten aus den Hybridisierungen von 30 Stämmen mit der RNA von nur 3 verschiedenen Arten (*Lc.mesenteroides*, *Lc.paramesenteroides*, *L.viridescens*). Es handelt sich demnach um eine Projektion der Anordnung der Stämme aus dem 3-dimensionalen Raum in eine Ebene.

Die enge Verwandtschaft der *Leuconostoc*-Arten (ohne *Lc.paramesenteroides* und *Lc.oenos*) untereinander und ihre nur geringe Ähnlichkeit mit den übrigen Milchsäurebakterien wird in dieser Darstellung wie auch schon im Ähnlichkeitsdiagramm von Abb. 4 deutlich. *L.plantarum* erscheint als eine Art Bindeglied. Der Cluster der mit *L.viridescens* eng verwandten Arten liegt wiederum von den Vertretern von *Leuconostoc* weit entfernt.

Abb. 6: Vernetzungsdiagramm als Ergebnis der Verrechnung der $\Delta Tm_{(e)}$ -Werte aus den Hybridisierungen der DNA 22 verschiedener Stämme mit der RNA folgender Arten: Lc.paramesenteroides, Lc.mesenteroides, L.buchneri, L.fermentum, L.casei, L.plantarum und L.gasseri mittels eines Computerprogramms.

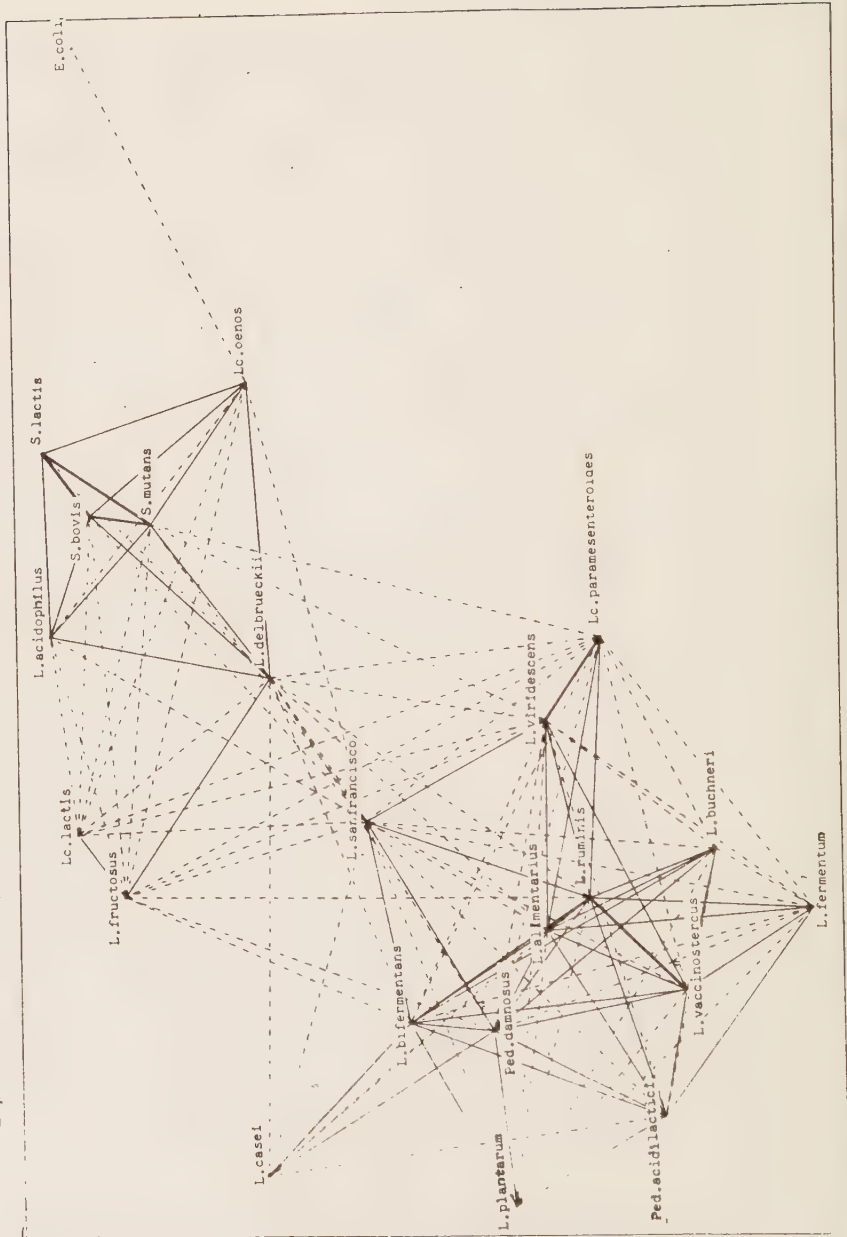
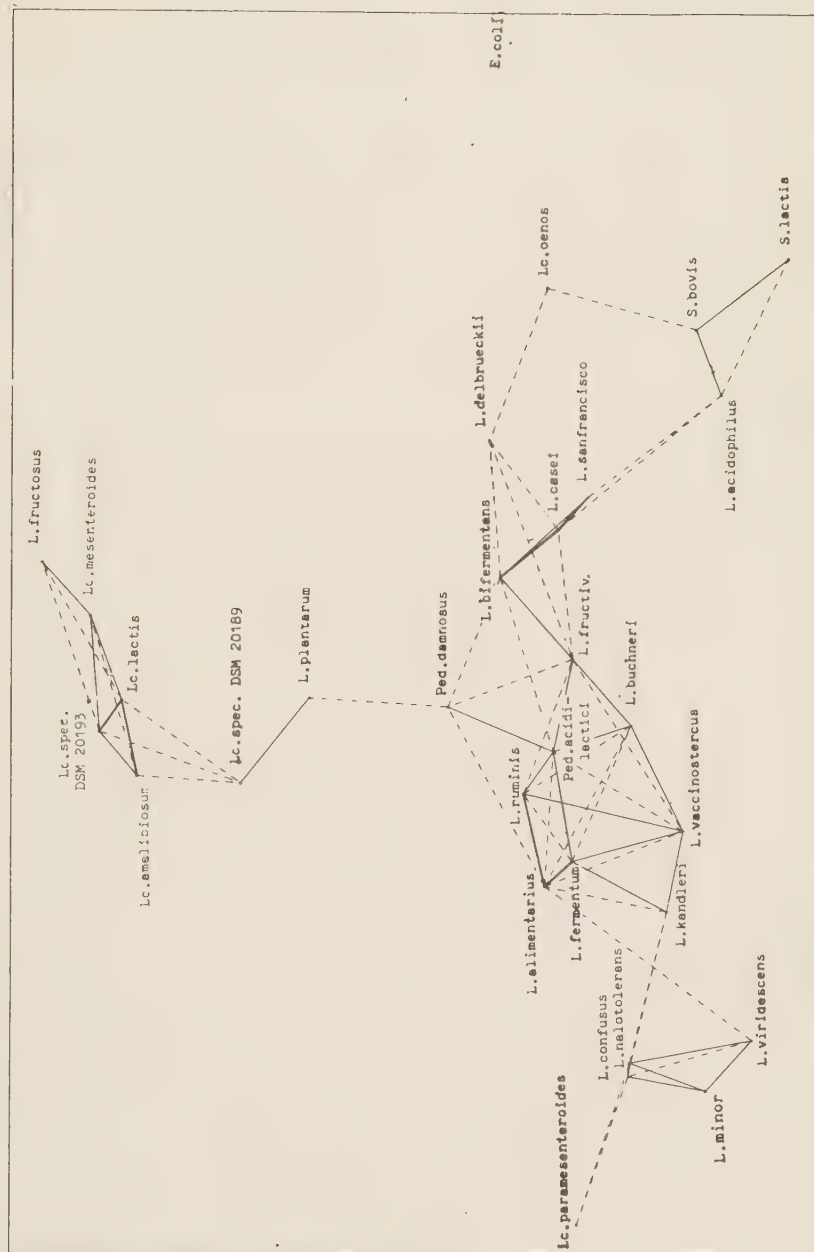


Abb. 7: Vernetzungsdiagramm als Ergebnis der Verrechnung der $\Delta Tm_{(e)}$ -Werte aus den Hybridisierungen der DNA 30 verschiedener Stämme mit der RNA folgender 3 Arten: *L.vinidescens*, *Lc.paramesenteroides* und *Lc.mesenteroides* mittels eines Computerprogramms.



3.2

16S rRNA-PARTIALSEQUENZIERUNG

In dem von Stackebrandt et al. (1983) auf der Basis von 16S rRNA-Partialsequenzierungen bzw. S_{AB} -Werten entwickelten Dendrogramm (Abb. 9) fällt auf, daß *L.brevis* mit der homofermentativen Art *L.plantarum* enger verwandt ist als mit den Vertretern der heterofermentativen Laktobazillen *L.viridescens* und *L.fermentum*. Um festzustellen, ob sich dies mit einer mit *L.brevis* verwandten Art bestätigen läßt, wurde die 16S rRNA von *L.buchneri* einer Partialsequenzierung unterworfen.

Die in den umrandeten Flecken des Fingerprints (Abb. 8) enthaltenen T_1 -resistenten Oligonukleotide der 16S rRNA des Typstamms von *L.buchneri* (20057) wurden sequenziert. Die Flecken 1 - 54 enthielten 68 verschiedene Hexamere oder höhere Oligomere, die restlichen nicht-nummerierten bestanden aus Pentameren oder noch kürzeren Oligonukleotiden, deren Sequenz für die Bestimmung des Ähnlichkeitskoeffizienten (S_{AB} -Wert) nicht benötigt wird.

Der Katalog der Oligonukleotidsequenzen (Tab. 27) der 16S rRNA von *L.buchneri* wurde mit den bereits bekannten "Katalogen" von Laktobazillen, *Ped.pentosaceus* und *Lc.mesenteroides* (Stackebrandt et al., 1983) verglichen. Zwischen *L.buchneri* und den verschiedenen Arten wurden folgende S_{AB} -Werte erhalten:

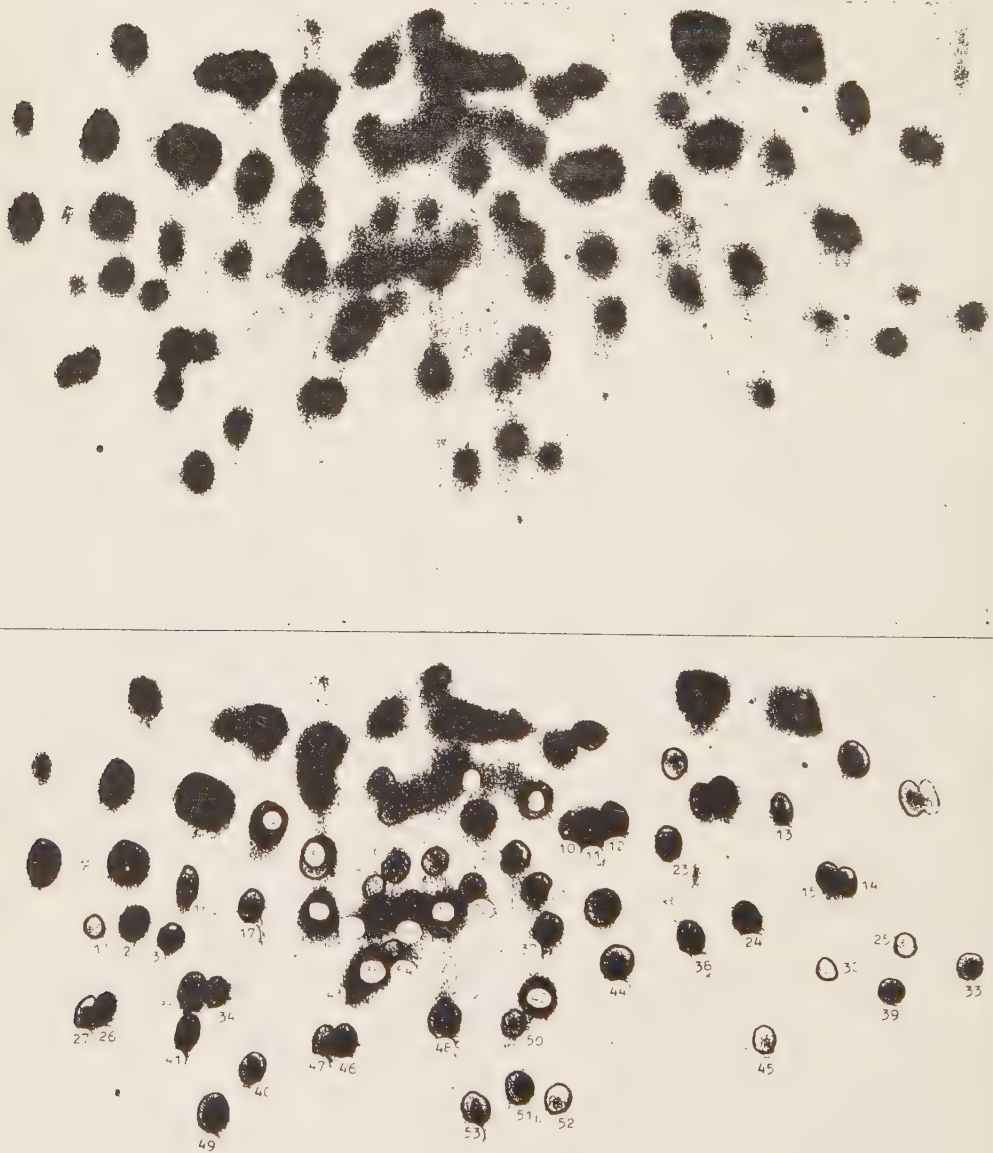
<i>L.brevis</i> :	0,66
<i>L.casei</i> :	0,62
<i>L.ruminis</i> :	0,62
<i>L.acidophilus</i> :	0,6
<i>Ped.pentosaceus</i> :	0,6
<i>L.plantarum</i> :	0,59
<i>L.bifermentans</i> :	0,59
<i>L.fermentum</i> :	0,59

<i>L.viridescens</i> :	0,56
<i>L.helveticus</i> :	0,55
<i>L.delbrueckii</i> subsp.	
<i>lactis</i> :	0,55
<i>Lc.mesenteroides</i> :	0,55

Mit Ausnahme von *L.brevis* (Teaching strain of the University of Illinois, Urbana) handelte es sich dabei jeweils um den Typstamm der Art.

Mit Werten zwischen 0,55 und 0,66 liegen die ermittelten S_{AB} -Werte in der Größenordnung der Daten, die auch zwischen den übrigen Laktobazillen gefunden wurden und auf die geringe genetische Ähnlichkeit der Angehörigen dieser Gattung bzw. auf ihr hohes phylogenetisches Alter hinweisen. *L.buchneri* ist mit keiner der in die Untersuchung einbezogenen *Lactobacillus*-Arten eng verwandt. Die größte Ähnlichkeit zeigt er mit dem *L.brevis*-Stamm ($S_{AB} = 0,66$), was in Einklang mit den Befunden der DNA-rRNA-Hybridisierungen steht und die Eingliederung von *L.buchneri* in einen gemeinsamen Subcluster mit *L.brevis* (im Dendrogramm von Abb. 9) ermöglicht. Er ergibt sich aus den S_{AB} -Werten zwar keine bevorzugte Verwandtschaft von *L.buchneri* zu *L.plantarum*, aber es bestätigt sich, daß *L.buchneri* mit homofermentativen *Lactobacillus*-Arten wie *L.casei* und *L.ruminis* näher verwandt ist als mit den heterofermentativen Arten *L.viridescens* und *L.fermentum*. Die niedrigsten S_{AB} -Werte weist *L.buchneri* erwartungsgemäß gegenüber *Lc.mesenteroides*, *L.delbrueckii* subsp.*lactis* und *L.helveticus* auf, nur für *L.acidophilus* wurde statt der nach dem Dendrogramm zu erwartenden 0,55 ein etwas höherer Wert von 0,6 ermittelt.

Abb. 8: "Fingerprint" der T_1 -gespaltenen 16S rRNA von *L.buchneri* 20057



Tab. 27: Oligonukleotid-katalog für 16S rRNA von *L.buchneri* 20057

3

6-mere		8-mere	
CACAAG	(1)	ACAAACCG	(26)
AAACCG	(2)	AACACCAG	(27)
AAACAG	(3)	CCCUUCAG	(18)
CCACUG	(4)	CCACAUUG	(28)
CUAACG	(5)	CCUACAUG	(28)
UAAACG	(6)	AUACCCUG	(29)
AAUACG	(7)	CUACAAUG	(30)
AAACUG	(7)	ACAUCUUG	(31)
UUCCCG	(8)	AUUUUAAG	(32)
CCUUCG	(9)	AUUUAUUG	(33)
CCCUUG	(9)		
UCCAUG	(8)	9-mere	
AUCCUG	(8)	UACACACCG	(34)
UCUAAG	(10)	CUACACACG	(35)
UAAUCG	(11)	CCUACCAAG	(35)
UAACUG	(12)	CUAAUACCG	(36)
UUUCCG	(13)	CUAACUACG	(36)
UUAAUG	(14)	AACUCCAUG	(36)
UAUUAG	(15)	CCCCUUAUG	(30)
		UAACCUUCG	(37)
7-mere		UACACUUAG	(38) n.bewiesen
		UUUAAUUCG	(39)
CACUCCG	(16)		
CAACUCG	(17)	10-mere	
UAACACG	(18)	AAACUCAAAG	(40)
UACAACG	(18)	CCAACCUAAG	(41)
UAACAAG	(18)	UAAAACUCUG	(42)
CAUUCAG	(19)	UCAC*ACCAUG	(43)
UAACCUG	(20)	ACAUCUUCUG	(44)
UAAUACG	(21)	AUAACAUUUG	(42)

Tab. 27 Fortsetzung:

CAUUAAG	(22)	AUUUAACAUG	(45)
UUCUCAG	(23)		
AUAUAUG	(24)		
AUUUUAG	(25)		

11-mere:

UAUCCAACCAG	(46)
AACCUUACCAG	(47)
CCUAAUACAUG	(48)

12-mere:

UAACACCCAAAG	(49)
CAACCCUUAUAG	(50)
UAAAAUCAUCAG	(51)

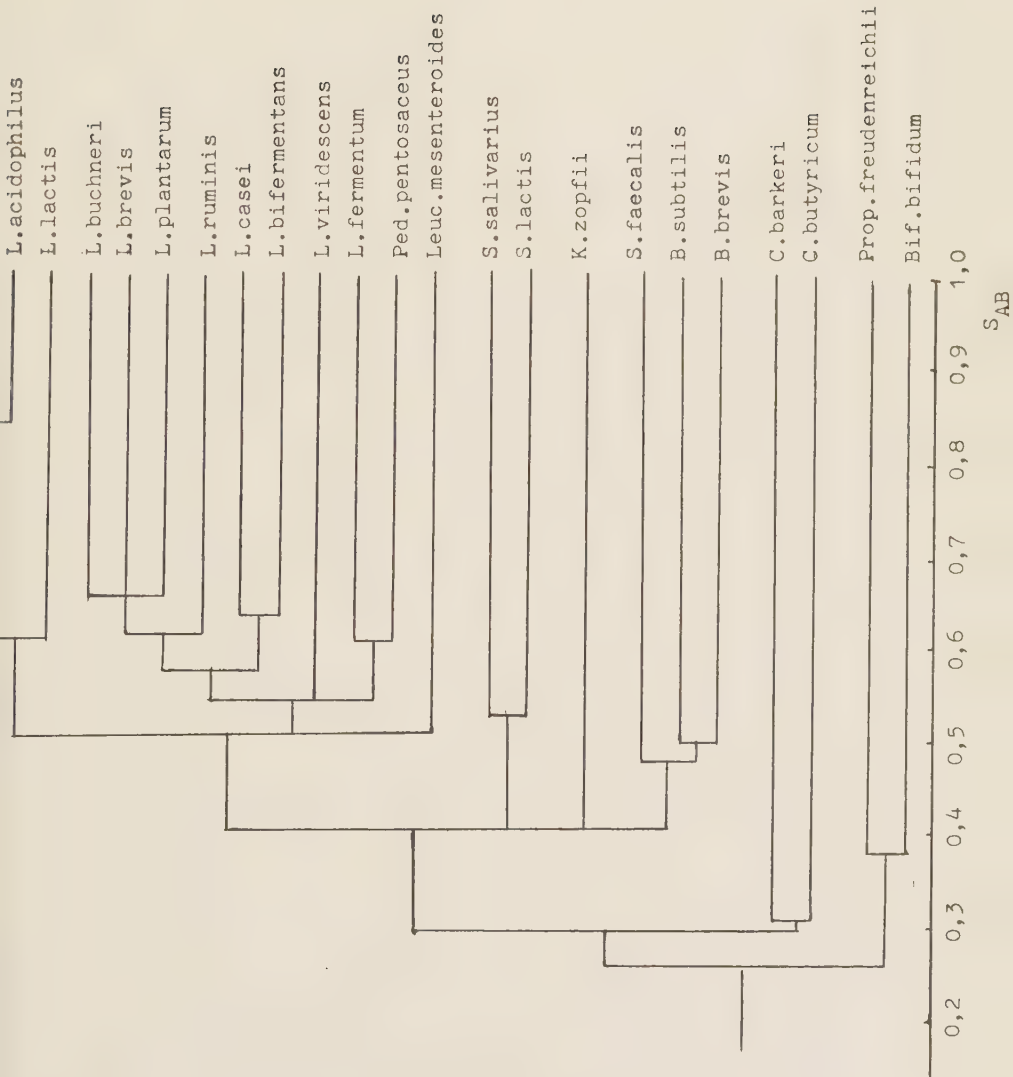
14-mere:

CCCAAACUCCUACG	(49)
CUAAUCUCUAAAAG	(52)
AAUCUCCACAAUG	(53)
AUCACCUCCUUUCU _{OH}	(54) (3'-Ende)

* = posttranskriptional modifiziertes Oligonukleotid

In Klammern sind die Nummern der Flecken des "Fingerprints" angegeben.

Abb. 9: Dendrogramm der Beziehungen zwischen Laktobazillen und anderen Vertretern des "Clostridien-Zweigs" der gram-positiven Eubakterien nach Stackebrandt et al. (1983), ergänzt durch *L.buchneri*.



IV.

DISKUSSION

1. TAXONOMIE DER HETEROFERMENTATIVEN LAKTOBAZILLEN UND LEUCONOSTOC-ARTEN AUFGRUND VON DNA-DNA-HOMOLOGIESTUDIEN

Bei den heterofermentativen Laktobazillen lassen sich im wesentlichen 3 verschiedene Mureintypen unterscheiden. Bei der größten Gruppe besteht die Interpeptidbrücke aus Asparaginsäure (Lys-Asp- bzw. Orn-Asp-Typ), bei einigen besteht sie aus einem oder zwei Alaninresten oder den Peptiden Ala-Ala-Ser, Ser-Ala oder Ala-Ala-Gly-Ala (Lys-Ala-, Lys-Ala₂-, Lys-Ser-Ala₂- Lys-Ala-Ser- bzw. Lys-Ala-Gly-Ala₂-Typ), und schließlich sind 2 Arten bekannt (*L.divergens* und *L.vaccinostercus*), bei denen eine direkte Quervernetzung über meso-Diaminopimelinsäure (DAP) vorliegt (Holzapfel und Gerber, 1983; Okada et al., 1979).

Bei den *Leuconostoc*-Arten gibt es bezüglich der Zellwand keine so große Vielfalt. Alle bekannten *Leuconostoc*-Arten besitzen die Peptide Ala-Ala, Ala-Ala-Ser oder Ser-Ala als Interpeptidbrücke des Mureins (Lys-Ala₂-, Lys-Ser-Ala₂- bzw. Lys-Ala-Ser-Typ).

1.1 LACTOBACILLUS-ARTEN, DIE MUREIN DES LYS-ASP-TYPS BESITZEN

Die Ergebnisse der DNA-DNA-Hybridisierungen zwischen den heterofermentativen Laktobazillen, die Murein des Lys-Asp-Typs besitzen, erlauben folgende Schlußfolgerungen:

Die schon zu Beginn der Arbeit gültig beschriebenen Arten *L.brevis*, *L.buchneri*, *L.collinoides*, *L.hilgardii*, *L.reuteri* und *L.fructivorans* müssen durch die Arten *L.kefir*, *L.lindneri* und eine weitere noch zu benennende Art, die wie *L.lindneri* aus neuen Bierisolaten besteht, ergänzt werden.

Auf der anderen Seite läßt sich der Species-Status für *L.heterohiochii* und *L.trichodes* nicht aufrechterhalten. Aufgrund

ihrer sehr hohen DNA-DNA-Homologien mit *L.fructivorans* müssen sie dieser Art zugeordnet und nunmehr als subjektive Synonyme von *L.fructivorans* betrachtet werden (Weiss et al., 1983).

Wie die Ergebnisse der DNA-DNA-Hybridisierungen zeigen, handelt es sich bei den in der 8. Ausgabe von Bergey's Manual (Buchanan und Gibbons, 1974) als "species incertae sedis" bezeichneten *L.frigidus*, *L.pastorianus*, *L.malefermentans* und *L.bifermentans* um eigenständige Arten, die mit den übrigen Betabakterien nur wenig verwandt sind. *L.bifermentans* wurde inzwischen auch in die "approved lists of bacterial names" (Skerman et al., 1980) aufgenommen (Kandler et al., 1983). Die nicht gültige Art *L.parvus* gehört entweder zu *L.malefermentans*, wofür die Ergebnisse der DNA-DNA-Hybridisierungen von Vescovo et al. (1979) sprechen oder nach den von uns mit *L.parvus* 20177 erhaltenen Ergebnissen zur *L.brevis*. Zur endgültigen Klärung der Zugehörigkeit bedarf es der Überprüfung der Identität der bei den Hybridisierungen verwendeten *L.parvus*-Stämme.

Die meisten dieser Arten mit Murein des Lys-Asp-Typs sind mit den üblichen phänotypischen Bestimmungsmerkmalen nur schwer unterscheidbar. Z. B. ähneln sich die Spektren an vergärbaren Zuckern der verschiedenen Arten sehr stark. Aber auch im G+C-Gehalt sind sie nur in wenigen Fällen von einander verschieden.

Das für die Identifizierung von Betabakterien mit dem Lys-Asp-Mureintyp wohl hilfreichste Merkmal ist die elektrophoretische Beweglichkeit der LDHs. Mit Hilfe der Laufstrecken dieser Enzyme im Polyacrylamidgel kann zwischen den sonst teilweise nur schwer unterscheidbaren Arten *L.brevis*, *L.buchneri*, *L.kefir*, *L.pastorianus*, *L.hilgardii* und *L.collinoides* unterschieden werden. Auch eine Differenzierung zwischen der neuen Art *L.lindneri* und *L.malefermentans* ist möglich. Ein Problem stellt jedoch die Unterscheidung von *L.buchneri* und *L.frigidus* dar, da diese

nicht nur in ihrem Zuckervergärungsspektrum und ihrem G+C-Gehalt, sondern auch in der elektrophoretischen Mobilität der LDHs übereinstimmen. Die eindeutige Zuordnung eines Stammes zu einer dieser beiden Arten kann bisher nur über DNA-DNA-Homologiestudien erfolgen. Der Suche nach leichter bestimmbareren Unterscheidungskriterien kommt hier große Bedeutung zu. Eine zwar genetisch vorhandene, phänotypisch aber nicht erkennbare Unähnlichkeit stellt auch die Frage nach der Zweckmäßigkeit einer Trennung in 2 verschiedene Arten.

Da die DNA-DNA-Hybridisierungen zwischen den verschiedenen Vertretern des Lys-Asp-Mureintyps in den meisten Fällen niedrige Homologiewerte ergaben, die in den Unschärfebereich der Renaturierungsmethode fallen, können keine Aussagen über die phylogenetischen Beziehungen zwischen den verschiedenen Arten gemacht werden. Die Verwandtschaftsgrade dieser Organismen sind offenbar zu niedrig, um mit der DNA-DNA-Hybridisierungsmethode erfaßt werden zu können. Mit Hilfe der DNA-rRNA-Hybridisierung war es dagegen möglich, eine relativ enge Verwandtschaft zwischen *L.buchneri*, *L.kefir* und *L.hilgardii* festzustellen.

1.2 LACTOBACILLUS- UND LEUCONOSTOC-ARTEN, DEREN INTERPEPTIDBRÜCKE NICHT AUS ASPARAGINSÄURE BESTEHT

Die klassischen Unterscheidungsmerkmale zwischen heterofermentativen Laktobazillen und der Gattung *Leuconostoc* sind neben der Morphologie die Bildung von optisch inaktiver Milchsäure anstelle von D-Lactat und die Fähigkeit, Ammoniak aus Arginin freizusetzen (Garvie, 1974).

Einige Betabakterien jedoch ähneln den *Leuconostoc*-Arten nicht nur hinsichtlich ihres Mureintyps und der Morphologie (oft sehr kurze, kokkoide Stäbchen), sondern auch in physiologischen Merkmalen wie der Dextranbildung (z.B. *L.confusus*, Holzapfel

und Kandler, 1969) und dem Unvermögen, Arginin zu spalten (z.B. *L.viridescens*, Niven und Evanş, 1957), was auch häufige Verwechslungen besonders zwischen *L.confusus* (daher der Name!) und *Lc.mesenteroides* zur Folge hatte (Sharpe et al., 1972). Aufgrund dieser physiologischen und biochemischen Gemeinsamkeiten war eine relativ enge Verwandtschaft zwischen solchen heterofermentativen Laktobazillen und Vertretern von *Leuconostoc* vermutet worden (Sharpe et al., 1972).

Die Ergebnisse der DNA-DNA-Homologiestudien sprechen allerdings nicht dafür, daß *L.confusus* und *L.viridescens* mit den *Leuconostoc*-Arten enger verwandt sind als mit den übrigen heterofermentativen Laktobazillen. Nur gegenüber *Lc.paramesenteroides* wurden etwas höhere, über dem "Background" der Hybridisierungsmethode liegende Homologien gefunden, die etwa den Werten entsprechen, die *L.confusus* und *L.viridescens* auch untereinander aufweisen (15 - 21 %).

Innerhalb der Gattung *Leuconostoc* muß eine Neuordnung vorgenommen werden. Die sich aufgrund der DNA-DNA-Homologiestudien ergebenden Änderungen in der Nomenklatur der *Leuconostoc*-Arten sind in Tab. 28 zusammengefaßt.

1) Zu *Lc. mesenteroides* gehören aufgrund der Hybridisierungsergebnisse eine Reihe von physiologisch sehr unterschiedlichen Stämmen:

- die zunächst als *Lc.cremoris* und *Lc.dextranicum* bezeichneten Stämme, die sich u. a. in ihren Zuckervergärungsspektren sehr deutlich vom Typstamm von *Lc.mesenteroides* unterscheiden (*Lc.mesenteroides* subsp. *cremoris* und *Lc.mesenteroides* subsp. *dextranicum*) (Garvie, 1983)
- die aufgrund der Peroxydbildung und des Fehlens der Dextranproduktion ursprünglich *Lc.paramesenteroides* zugeordneten und als *Lc.paramesenteroides* subsp. *lactophilum* bezeichneten Stämme.

Lc.mesenteroides ist also eine bezüglich der phänotypischen Merkmale sehr heterogene Art.

2) Der von deMoss (1951) für seine stoffwechselphysiologischen Untersuchungen verwendete *Lc.mesenteroides*-Stamm (20193) kann dagegen aufgrund seiner niedrigen DNA-DNA-Homologien mit dem Typstamm nicht mehr dieser Art zugerechnet werden.

3) Die früher als *Lc.mesenteroides* subsp.*amelibiosum* (Holzapfel Dissertation, 1969) bezeichneten Stämme, die sich von *Lc.mesenteroides* im Mureintyp (Lys-Ala_2) und auch im Zuckervergärungsspektrum unterscheiden, stellen Vertreter einer eigenen Species dar (*Lc.amelibiosum*).

4) Die Stämme von *Lc.lactis* sind genetisch einheitlich und zeigen mit keiner anderen Art hohe Homologien.

5) *Lc.paramesenteroides* weist mit den übrigen *Leuconostoc*-Arten kaum DNA-DNA-Homologien auf und ist offenbar mit den heterofermentativen Laktobazillen *L.confusus* und *L.viridescens* enger verwandt.

6) *Lc.oenos* ist von den übrigen *Leuconostoc*-Arten phylogenetisch sehr weit entfernt und möglicherweise ein Vertreter einer eigenen Gattung.

7) Das Sauerkrautisolat 20189 ist mit keiner der bekannten Arten eng verwandt und somit ein Vertreter einer neuen *Leuconostoc*-Species.

Stamm	frühere Bezeichnung	neue Bezeichnung
20343*	Lc.mesenteroides	Lc.mesenteroides subsp. mesenteroides (Garvie, 1983)
20346* 20200	Lc.cremoris	Lc.mesenteroides subsp. cremoris (Garvie, 1983)
20484*	Lc.dextranicum	Lc.mesenteroides subsp. dextranicum (Garvie, 1983)
20185 20201	Lc.paramesenteroides subsp. lactophilum	Lc.mesenteroides
20193	Lc.mesenteroides	Lc.spec.
20188 10882	Lc.mesenteroides subsp. amelibiosum	Lc.amelibiosum
15520	L.batatas	Lc.lactis

Tab. 28: Veränderungen in der Taxonomie der Leuconostoc-Arten aufgrund von DNA-DNA-Homologiestudien

*: Typstamm

DENDROGRAMM DER MILCHSÄUREBAKTERIEN AUF DER GRUNDLAGE DER DNA-rRNA-HYBRIDISIERUNGSERGEBNISSE

In Abb. 10 wurde versucht, ein Dendrogramm zu konstruieren, das die phylogenetischen Beziehungen der Lactobacillus- und Leuconostoc-Arten, sowie einiger Hauptvertreter der Gattungen Pediococcus und Streptococcus widerspiegelt.

Die Grundlage des Dendrogramms bildet eine Distanzmatrix, die mit Hilfe eines Computerprogramms nach der "Manhattan"-Metrik aus $\Delta Tm_{(e)}$ -Werten errechnet und dem Single linkage clustering-Verfahren unterworfen worden war (Ohmayer et al., 1980). Für die Erstellung der Distanzmatrix wurden dieselben Daten wie für das Vernetzungsdiagramm in Abb. 6 verwendet, d. h. es wurden nur Stämme berücksichtigt, von denen $\Delta Tm_{(e)}$ -Werte aus Hybridisie-

rungen mit der RNA von 7 verschiedenen Arten (*Lc.mesenteroides*, *Lc.paramesenteroides*, *L.buchneri*, *L.fermentum*, *L.casei*, *L.plantarum* und *L.gasseri*) zur Verfügung standen.

Das entstehende Dendrogramm wurde dann mit den Arten ergänzt, deren DNA nicht mit allen 7 verschiedenen RNAs hybridisiert worden war. In diesen Fällen wurden Zuordnungen aufgrund niedriger $\Delta Tm_{(e)}$ -Werte ($< 5,5$) bzw. hoher DNA-DNA-Homologien vorgenommen. Z.B. konnten *L.kefir*, *L.hilgardii*, *L.frigidus*, *L.collinoides*, *L.brevis*, *L.pastorianus*, *L.malefermentans*, *L.divergens*, *L.lindneri* und *L.fructivorans* aufgrund der niedrigen $\Delta Tm_{(e)}$ -Werte, die die Hybridisierungen mit der RNA von *L.buchneri* ergaben, zusammen mit dieser Art in einem gemeinsamen Cluster vereinigt werden.

L.sake, *L.delbrueckii* subsp.*lactis*, *L.delbrueckii* subsp.*bulgaricus*, *L.casei* subsp. *pseudoplanarum*, *L.casei* subsp.*tolerans*, *L.pentosus* und *L.farciminis* wurden den Arten zugeordnet, mit denen sie hohe DNA-DNA-Homologien aufweisen.

DNA-DNA-Hybridisierungen verschiedener Autoren hatten eine enge Verwandtschaft zwischen *L.sake* und *L.curvatus* (47 % Homologien nach Dellaglio et al., 1975), zwischen den Unterarten von *L.delbrueckii* (78 - 108 % Homologien nach Weiss et al., 1983), zwischen den Unterarten von *L.casei* (Dellaglio et al., 1975), zwischen *L.farciminis* und *L.alimentarius* (20 - 40 % Homologien nach Kagermeier, Dissertation, 1981) und *L.plantarum* und *L.pentosus* (40 % Homologien nach Sharpe et al., 1977) ergeben.

Außerdem konnte *L.helveticus* aufgrund seines hohen S_{AB} -Werts (0,84) mit *L.acidophilus* (Stackebrandt et al., 1983) in einen gemeinsamen Subcluster eingeordnet werden.

Nicht in das Dendrogramm aufgenommen werden konnten die Arten *L.amylophilus*, *L.amylovorus*, *L.salvarius*, *L.vitulinus* und *L.maltaromicus*, weil für diese sämtliche vortiegenden $\Delta Tm_{(e)}$ -Werte höher als 5,5 waren und somit keine Zuordnung vorgenommen werden konnte. Unter diesen Arten fällt *L.vitulinus* durch seine besonders hohen $\Delta Tm_{(e)}$ -Werte auf. Er weist bei allen mit ihm durchgeführten Hybridisierungen, d. h. gegenüber *L.buchneri* wie auch gegenüber *L.casei*, *L.plantarum* und

L.gasseri den jeweils höchsten $\Delta T_{m(e)}$ -Wert auf, woraus man auf eine im Vergleich zu den übrigen Arten extrem niedrige Verwandtschaft von *L.vitulinus* zu den Laktobazillen schließen kann. Möglicherweise handelt es sich bei dieser Art um den Vertreter einer anderen Gattung. Gewißheit darüber können aber erst weitere phylogenetische Studien (z. B. S_{AB} -Bestimmungen) geben.

Das Dendrogramm setzt sich aus 3 Hauptclustern zusammen:

Cluster I enthält den größten Teil der Laktobazillen (darunter alle Beta- und Streptobakterien, d.h. die fakultativ und obligat heterofermentativen Arten), die Pediokokken und außerdem *Ent.faecalis* und einen Vertreter von *Leuconostoc* (*Lc.paramesenteroides*). Der geringe Verwandtschaftsgrad von *Lc.paramesenteroides* mit den übrigen Vertretern dieser Gattung war schon durch DNA-DNA-Homologiestudien erkannt und durch die DNA-rRNA-Hybridisierungsexperimente bestätigt worden. Seine relativ enge Verwandtschaft mit heterofermentativen Laktobazillen, die einen ähnlichen Mureintyp aufweisen und mit ihm einen gemeinsamen Subcluster bilden (*L.viridescens*, *L.confusus*, *L.halotolerans*, *L.minor*, *L.kandleri*) spricht dafür, daß es sich nicht um eine *Leuconostoc*- sondern um eine *Lactobacillus*-Art handelt. *L.sanfrancisco*, der ebenfalls statt Asparaginsäure Alanin in der Interpeptidbrücke seines Mureins aufweist, nimmt eine isolierte Stellung ein.

Die Betabakterien, die den Lys-Asp-Mureintyp besitzen, bilden im wesentlichen einen Subcluster um *L.buchneri*, nur *L.bifermentans* und *L.reuteri* gehören diesem nicht an. Letzterer ist *L.fermentum* (Orn-Asp) ähnlicher.

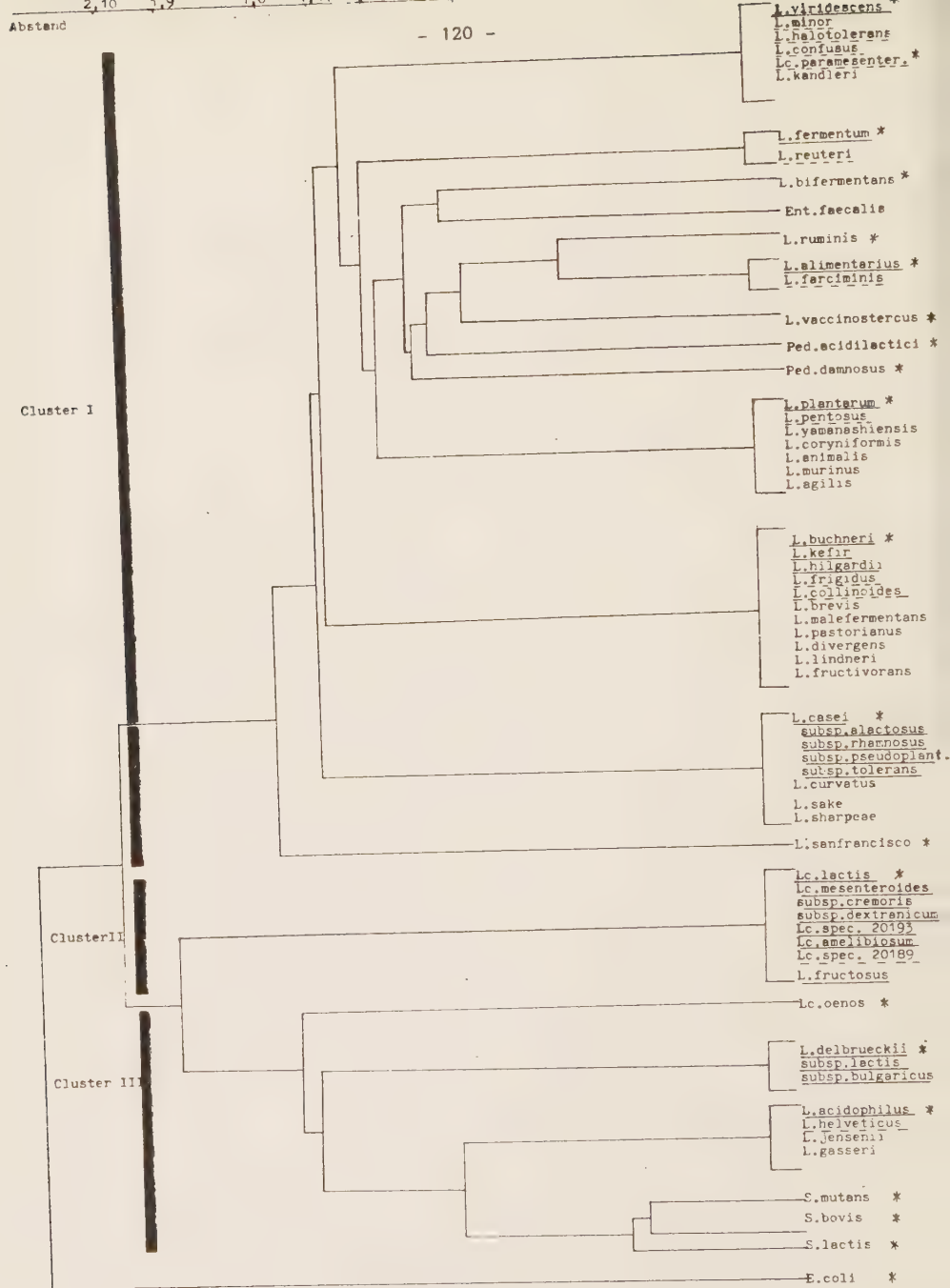


Abb. 10: Dendrogramm der Beziehungen zwischen Laktobazillen und Vertretern der Gattungen Leuconostoc, Pediococcus und Streptococcus aufgrund von DNA-rRNA-Hybridisierungen

Erläuterungen zu Abb. 10:

Mit * versehen wurden die Arten, die mit allen 7 verschiedenen RNAs hybridisiert worden waren.

Unterstrichen wurden die Arten, die sehr eng miteinander verwandt sind (DNA-DNA-Homologie $\geq 50\%$, oder $\Delta Tm_{(e)} \leq 1,0$)

Eine gestrichelte Linie bedeutet eine weniger enge Verwandtschaft (DNA-DNA-Homologie $\geq 20\%$ oder $1,0 < \Delta Tm_{(e)} < 3,0$)

Die restlichen Arten sind nur entfernt miteinander verwandt.

Einige Arten, bei denen die DNA-rRNA-Hybridisierungen nur hohe $\Delta Tm_{(e)}$ -Werte ($> 5,5$) ergeben hatten, konnten in keinen der Cluster eingeordnet werden (*L.amylophilus*, *L.amylovorus*, *L.salivarius*, *L.vitulinus* und *L.maltaromicus*).

Die fakultativ heterofermentativen Laktobazillen verteilen sich auf mehrere Subcluster, denen auch einige obligat homofermentative Arten angehören. *L.casei* bildet mit seinen Unterarten sowie *L.curvatus*, *L.sake* und *L.sharpeae* eine Gruppe verwandter Arten, *L.plantarum* mit *L.pentosus*, *L.yamanashiensis* und anderen eine weitere, während *L.alimentarius* und *L.ruminis* offenbar der obligat heterofermentativen Art *L.vaccinostercus* näherstehen.

Die 2 untersuchten *Pediococcus*-Arten bilden keinen eigenen Hauptcluster, sondern sind, wie schon erwähnt, ebenfalls Angehörige von Cluster I. Es besteht demnach offenbar eine relativ nahe Verwandtschaft der *Pediokokken* zu den Strepto- und Betabakterien.

Ebenfalls zu Cluster I gehört auch *Enterococcus faecalis*, der früher als *Streptococcus faecalis* bezeichnet, aber von Schleifer und Kilpper-Bälz (1984) aufgrund seiner nur geringen Verwandtschaft mit den übrigen Streptokokken aus der Gattung *Streptococcus* ausgegliedert wurde.

Cluster II besteht abgesehen von *L.fructosus* nur aus *Leuconostoc*-Arten. Alle Vertreter dieser Gattung außer *Lc.paramesenteroides* und *Lc.oenos* sind hier zu einer Gruppe vereinigt. Somit entspricht die auf der Verrechnung von $\Delta Tm_{(e)}$ -Werten beruhende Clusterung im wesentlichen der klassischen aufgrund von phenetischen Merkmalen vorgenommenen Gruppierung zu einer Gattung.

L.fructosus muß nach den Befunden der DNA-rRNA-Hybridisierungen ebenfalls als Angehöriger der Gattung *Leuconostoc* betrachtet werden, obwohl die DNA-DNA-Hybridisierungen nur niedrige Homologien zwischen dieser Art und den Vertretern von *Leuconostoc* ergeben hatten.

Lc.oenos ist mit den übrigen *Leuconostoc*-Arten kaum verwandt und dürfte wohl der Vertreter einer eigenen Gattung sein. Auf die verwandtschaftlichen Beziehungen von *Lc.paramesenteroides*, die für eine Zugehörigkeit zu den Laktobazillen sprechen, wurde schon verwiesen.

Zu Cluster III gehören neben *Lc.oenos* zum einen die klassischen Thermobakterien *L.delbrueckii*, *L.acidophilus*, *L.helveticus*, *L.jensenii* und *L.gasseri* und zum anderen die Vertreter der Streptokokken (*S.mutans*, *S.bovis* und *S.lactis*).

Die scheinbar relativ enge phylogenetische Beziehung zwischen diesen sehr verschiedenen Bakteriengruppen ist das Ergebnis der angewendeten Clusterungsmethode. Sowohl die Thermobakterien wie auch die Streptokokken weisen nämlich bei den DNA-rRNA-Hybridisierungen gegenüber sämtlichen eingesetzten RNAs sehr hohe $\Delta Tm_{(e)}$ -Werte auf, was bei der Errechnung der Abstände in der Distanzmatrix zu sehr ähnlichen Ergebnissen und damit schließlich zu einer Zusammenfassung dieser Arten in einem gemeinsamen Cluster führt. Einen Hinweis auf die nur geringe Verwandtschaft zwischen obligat homofermentativen Laktobazillen und Streptokokken liefern die hohen $\Delta Tm_{(e)}$ -Werte (9,3 - 9,5), die sich bei der Hybridisierung der RNA des Thermobakteriums *L.gasseri* mit der DNA von Streptokokken ergaben.

Die Thermobakterien verteilen sich auf 2 Subcluster:

Die Arten des 1. Subclusters (*L.acidophilus*, *L.helveticus*, *L.gasseri* und *L.jensenii*) weisen alle einen niedrigen G+C-Gehalt (zwischen 33 und 40 %) auf, während dieser bei den Vertretern des 2. Subclusters (*L.delbrueckii* und seine Unterarten) bei 50 % liegt. Dieselbe Gliederung ergibt sich auch aus immunologischen Studien der LDHs verschiedener Laktobazillen (Gasser und Gasser, 1971).

Lc.oenos bildet eine eigene Linie, und die Streptokokken einen weiteren Subcluster.

Diese 3 Hauptcluster stimmen zwar nicht mit der klassischen Einteilung der Milchsäurebakterien in die Gattungen *Lactobacillus*, *Streptococcus*, *Pediococcus* und *Leuconostoc* und auch nicht mit Orla Jensen's (1919) Gliederung der stäbchenförmigen Milchsäurebakterien in Thermo-, Strepto- und Betabakterien überein. Dafür ergibt sich aber eine gute Übereinstimmung mit dem auf der Grundlage von S_{AB} -Werten konstruierten Dendrogramm von Stackebrandt et al. (1983). Dieses in Abb. 9 dargestellte Dendrogramm zeigt, daß sich auch bei einem direkten Vergleich der Sequenzen von 16S rRNA-Oligonukleotiden der verschiedenen Arten eine Einteilung in die gleichen 3 Hauptcluster ergibt. Die meisten *Lactobacillus*-Arten befinden sich zusammen mit *Ped.pentosaceus* in Cluster 1, *Lc.mesenteroides* bildet den 2. Cluster und die obligat homofermentativen Arten *L.helveticus*, *L.acidophilus* und *L.lactis* (= *L.delbrueckii* subsp. *lactis*) den 3. Cluster. Die nur entfernte Verwandtschaft der Streptokokken mit den übrigen Milchsäurebakterien wird hier deutlicher. Sie befinden sich in einem eigenen Cluster.

Außerdem unterscheiden sich die beiden Dendrogramme bezüglich der Zuordnung von *Ent.faecalis*. Diese Art gehört in Abb. 10 zu Hauptcluster 1, befindet sich jedoch in dem auf S_{AB} -Werten beruhenden Dendrogramm von Abb. 9 außerhalb der 3 Hauptcluster und steht den Bazillen näher.

Bei einer genaueren Betrachtung der S_{AB} -Werte von *Ent.faecalis* zeigt sich aber, daß die Werte nicht unbedingt für eine engere Beziehung dieser Species zu den *Bacillus*-Arten sprechen, sondern daß der höchste Wert (0,51) mit *L.ruminis* auftritt und mit anderen Vertretern des 1. Hauptclusters wie z. B. *L.casei* und *L.viridescens* sowie *Ped.pentosaceus* die gleichen Werte (0,47 - 0,49) wie mit *Bac. subtilis* (0,49) und *Bac.brevis* (0,47) gefunden wurden. Die S_{AB} -Werte sprechen also nicht gegen eine Eingliederung von *Ent.faecalis* in den Hauptcluster 1.

In Abb. 11 wurde der Versuch unternommen, die beiden Dendrogramme, denen sowohl unterschiedliche Daten wie auch unterschiedliche Clusterungsverfahren (Single linkage- bzw. average linkage-Verfahren) zugrundeliegen, zu kombinieren.

Dabei wurde in den Fällen, wo die Gruppierungen nicht übereinstimmten jeweils die Clusterung gewählt, für die gravierende Gründe sprachen. So läßt sich z. B. die Ausgliederung der Streptokokken aus dem gemeinsamen Cluster mit den obligat homofermentativen Laktobazillen, d. h. die Wahl der in Abb. 9 realisierten Clusterung dadurch rechtfertigen, daß die RNA der obligat homofermentativen *Lactobacillus*-Art *L.gasseri* bei den Hybridisierungen mit DNA von Streptokokken sehr hohe $\Delta T_{m(e)}$ -Werte lieferte, was auf eine nur entfernte Verwandtschaft zwischen diesen beiden Bakteriengruppen deutet. Für eine relativ "frühe Aufspaltung" der *Streptococcus*-Arten *S.bovis*, *S.lactis* und *S.mutans* sprachen die DNA-rRNA-Hybridisierungsergebnisse von Garvie und Farrow (1981) und Kilpper-Bälz et al. (1982).

L.amylophilus und *L.amylovorus* wurden in den Cluster der obligat homofermentativen Laktobazillen eingeordnet, da man aufgrund der $\Delta T_{m(e)}$ -Werte auf eine gewisse Verwandtschaft dieser Arten zu *L.gasseri* schließen kann. *L.vitulinus*, *L.salivarius* und *L.maltaromicus* konnten dagegen nicht in das Dendrogramm eingegliedert werden, da sie nach den Ergebnissen der DNA-DNA- und DNA-rRNA-Hybridisierungen mit allen bisher getesteten Arten keine signifikante Verwandtschaft aufweisen und auch ihre S_{AB} -Werte bisher nicht bestimmt wurden.

Legende zu Abb. 11:

Die Clusterungen auf den Ebenen a - g beruhen

bei a auf: DNA-DNA-Hybridisierungsergebnissen (bei der Filtermethode Homologien $\geq 30\%$)

bei b auf: DNA-rRNA-Hybridisierungsergebnissen ($\Delta T_{m(e)} \leq 5,5$)

bei c - g auf: S_{AB} -Werten bzw. mittels eines Computerprogramms aus $\Delta T_{m(e)}$ -Werten berechneten Abständen (siehe IV.2).

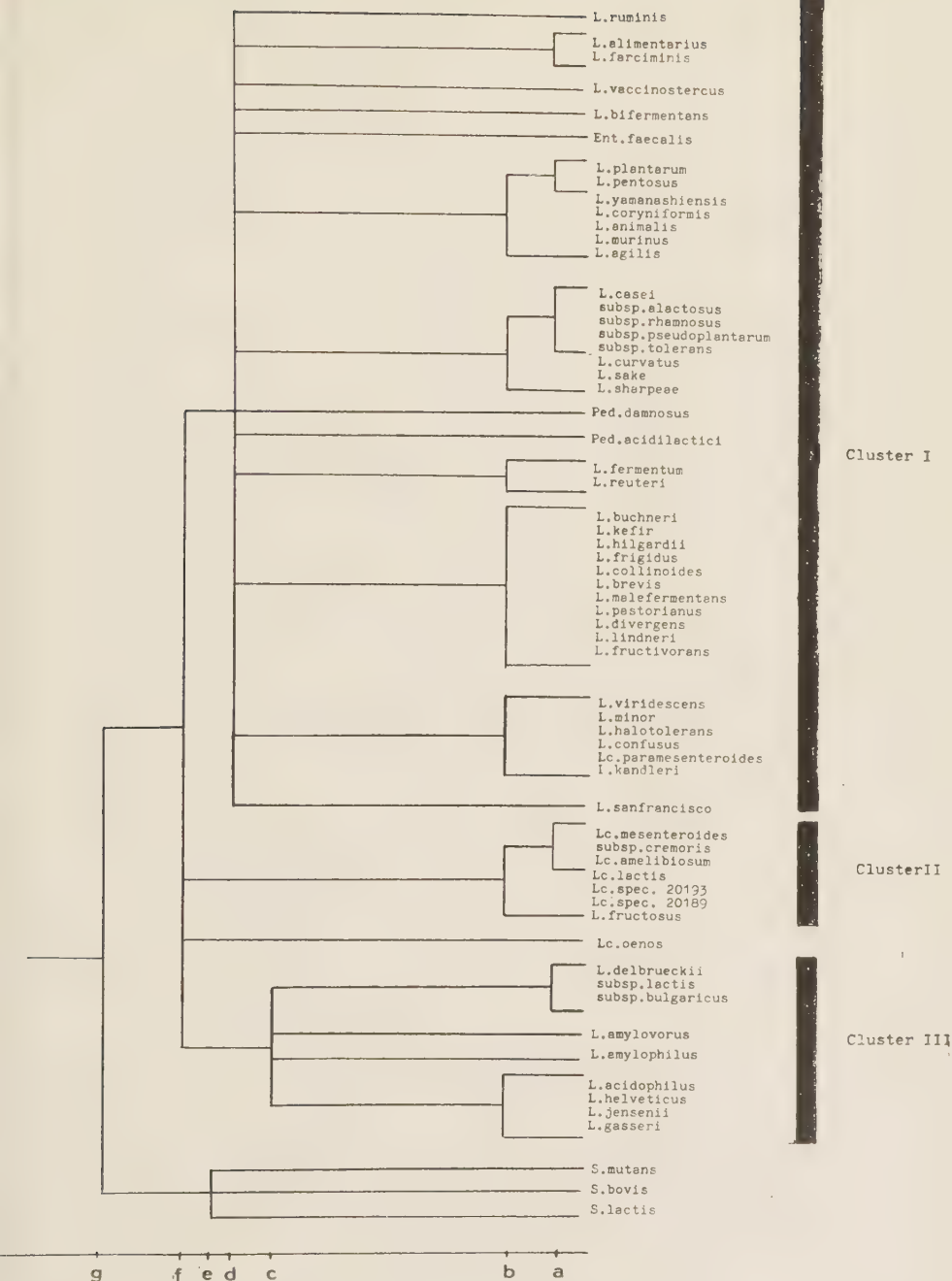


Abb. 11: Dendrogramm der Milchsäurebakterien als Ergebnis der Kombination der auf DNA-rRNA-Hybridisierungen und S_{AB} -Werten beruhenden Dendrogramme der Abb. 9 und 10.

V. ZUSAMMENFASSUNG

1. TAXONOMIE DER HETEROFERMENTATIVEN LACTOBACILLUS- UND LEUCONOSTOC-ARTEN

Die DNA-DNA-Homologiestudien zeigen, daß die meisten Betabakterien, die sich durch den Lys-Asp-Mureintyp auszeichnen, untereinander nur wenig verwandt sind, daß aber die Typstämme von *L.heterohiochii*, *L.trichodes* und *L.fructivorans* zu ein- und derselben Art gehören und daß es sich bei mehreren von Spicher und Schröder (1978) als *L.brevis* var. *lindneri* bezeichneten Stämmen um Angehörige der Art *L.sanfrancisco* handelt. Die vergleichenden biochemisch-physiologischen Untersuchungen und DNA-DNA-Hybridisierungen an 30 Bierisolaten des Lys-Asp-Mureintyps ergaben, daß neben Vertretern von *L.brevis* (15 Stämme) und *L.frigidus* (3 Stämme) 2 weitere Betabakterienarten im Bier vorkommen, die mit keiner bekannten *Lactobacillus*-Art eng verwandt sind und daher 2 neue Species darstellen (*L.lindneri*, *L.spec.*). Auch bei den *Leuconostoc*-Arten ließen sich mehrere Stämme keiner der bekannten Species zuordnen:

Lc.mesenteroides 20193 und die als *Lc.mesenteroides* subsp. *ameibiosum* (Holzapfel, Dissertation, 1969) bezeichneten Stämme zeigten weder mit dem Typstamm von *Lc.mesenteroides* noch mit einer anderen *Leuconostoc*-Art sehr hohe DNA-DNA-Homologien. Dies gilt auch für einen aus Sauerkraut isolierten Stamm, der somit ebenfalls als Vertreter einer neuen *Leuconostoc*-Art angesehen werden muß.

2. TAXONOMIE DER MILCHSÄUREBAKTERIEN

Das auf der Grundlage der DNA-rRNA-Hybridisierungsergebnisse entwickelte Dendrogramm (Abb. 10) zeigt, daß sich die Milchsäurebakterien auf 3 Hauptcluster verteilen, die nicht mit den klassischen Gattungen übereinstimmen.

Der 1. Cluster umfaßt die heterofermentativen und einen Großteil der homofermentativen Laktobazillen, sowie die Entero- und Pediokokken. Außerdem gehört ihm *Lc.paramesenteroides* an, der mit mehreren *Lactobacillus*-Arten, die einen ähnlichen Mureintyp besitzen, einen Subcluster bildet.

Alle übrigen *Leuconostoc*-Arten mit Ausnahme von *Lc.oenos* lassen sich zusammen mit *L.fructosus* in einem 2. Cluster zusammenfassen, und der 3. Hauptcluster besteht aus *Lc.oenos*, den klassischen Thermobakterien und den Streptokokken, wobei die scheinbar enge Verwandtschaft zwischen diesen 3 verschiedenen Bakteriengruppen nur durch die allen 3 Gruppen gemeinsame geringe thermische Stabilität ihrer DNA-rRNA-Hybride mit den Referenz-RNAs zustandekommt.

Die Bestimmung der Sequenzen T_1 -resistenter 16S rRNA-Oligonukleotide von *L.buchneri* bestätigte, daß ein Teil der heterofermentativen Arten wie *L.brevis* und *L.buchneri* mit homofermentativen Laktobazillen näher verwandt ist als mit anderen heterofermentativen Arten wie *L.viridescens* und *L.fermentum*.

VI.

LITERATURVERZEICHNIS

- Albersheim, P., Nevins, D.J., Englis, P.D., Karr, A.: A method for the analysis of sugars in plant cell-wall polysaccharides by gas-liquid chromatography. *Carbohydr. Res.* 5, 340-345 (1967).
- Back, W.: Bierschädliche Bakterien. *Möchr. Brauerei* 34, 267-276 (1981)
- Back, W., Stackebrandt, E.: DNS/DNS-Homologiestudien innerhalb der Gattung *Pediococcus*. *Arch. Mikrobiol.* 118, 79-85 (1978).
- Bendich, A.J., McCarthy, B.J.: Ribosomal RNA homologies among distantly related organisms. *Proceed. Nation. Acad. Sciences* 65, 349-356 (1970).
- Bergey, D.H., Harrison, F.C., Breed, R.S., Hammer, B.W., Huntoon, F.M.: *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology*, 1st ed. The Williams and Wilkins Co., Baltimore 1923.
- Beutler, H.O., Michal, G.: Neue Methode zur enzymatischen Bestimmung von Äthanol in Lebensmitteln. *Fresenius'Z. Anal. Chem.* 284, 113-177 (1977)
- Birnstiel, M.L., Sells, B.H., Purdom, I.F.: Kinetic complexity of RNA molecules. *J. Mol. Biol.* 63, 21-39 (1972).
- Bradley, S.G.: Interspecific genetic homology in the Actinomycetes. *Int. Bull. Bact. Nomencl. Taxon.* 15, 239-241 (1965).

- Brenner, D.J.: Deoxyribonucleic acid reassociation in the taxonomy of enteric bacteria. *Int. J. system. Bact.* 23, 298-307 (1973)
- Buchanan, R.E., Gibbons, N.E.: *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology*, 8th ed. The Williams and Wilkins Co., Baltimore 1974
- Burton, K.: Determination of DNA concentration with diphenylamine. In: *Methods in Enzymology XII. B.* (L. Grossman and K. Moldave, eds.) 163-166, Academic Press, New York - London 1968.
- Buyze, G., Van den Hamer, C.J.A., De Haan, P.G.: Correlation between hexose monophosphate shunt, glycolytic system and fermentation type in lactobacilli. *Antonie van Leeuwenhoek*, 23, 345-350 (1957).
- Carr, J.G., Davies, P.A.: Homofermentative lactobacilli of ciders including *Lactobacillus mali* nov. spec. *J. appl. Bact.* 33, 768-774 (1970).
- Dakin, J.C., Radwell, J.Y.: Lactobacilli causing spoilage of acetic acid preserves. *J. appl. Bact.* 34, 541-545 (1971).
- De Ley, J., Cattoir, H., Reynaerts, A.: The quantitative measurement of DNA hybridization from renaturation rates. *Europ. J. Biochem.* 12, 133-142 (1970).
- De Ley, J., De Smedt, J.: Improvements of the membrane filter method for DNA/rRNA hybridization. *Antonie van Leeuwenhoek* 41, 287-307 (1975).

- Dellaglio, F., Bottazzi, V., Trovatelli, L.D.: Deoxyribonucleic acid homology and base composition in some thermophilic lactobacilli. *J. gen. Microbiol.* 74, 289-297 (1973).
- Dellaglio, F., Bottazzi, V., Vescovo, M.: Deoxyribonucleic acid homology among *Lactobacillus* species of the subgenus *Streptobacterium* Orla-Jensen. *Int. J. system. Bact.* 25, 160-172 (1975).
- Dellaglio, F., Trovatelli, L.D., Sarra, P.G.: DNA-DNA homology among representative strains of the genus *Pediococcus*. *Zbl. Bakt. Hyg., I. Abt. Orig. C2*, 140-150 (1981).
- De Man, J.C., Rogosa, M., Sharpe, M.E.: A medium for the cultivation of lactobacilli. *J. appl. Bact.* 23, 130-135 (1960).
- De Moss, R.D., Bard, R.C., Gunsalus, I.C.: The mechanism of the heterolactic fermentation: a new route of ethanol formation. *J. Bact.* 62, 499-511 (1951).
- Denhardt, D.T.: A membrane-filter technique for the detection of complementary DNA. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 23, 641-646 (1966).
- Dennis, D.: Lactic acid racemase. In: *Methods in Enzymology V*, (L. Grossman and K. Moldave, eds.) 427-430, Academic Press, New York - London 1962.
- De Smedt, J., De Ley, J.: Intra- and intergeneric similarities of *Agrobacterium* ribosomal ribonucleic acid cistrons. *Int. J. system. Bact.* 27, 222-240 (1977).

De Vries, W., Kapteijn, W.M.C., Van der Beek, E.G., Stouthamer, A.H.: Molar growth yields and fermentation balances of *Lactobacillus casei* L3 in batch cultures and in continuous cultures. *J. gen. Microbiol.* 63, 333-345 (1970).

Eltz, R.W., Vandemark, P.J.: Fructose dissimilation by *Lactobacillus brevis*. *J. Bact.* 79, 763-776 (1960).

Eschenbecher, F.: Zur Kenntnis der biersäuernden Laktobazillen. *Brauwissenschaft* 21, 424-437, 464-471 (1968), 22, 14-28 (1969).

Fiedler, F., Schäffler, M.J., Stackebrandt, E.: Biochemical and nucleic acid hybridisation studies on *Brevibacterium linens* and related strains. *Arch. Microbiol.* 129, 85-93 (1981).

Fox, G.E., Pechman, K.R., Woese, C.R.: Comparative cataloging of 16s ribosomal ribonucleic acid: molecular approach to procaryotic systematics. *Int. J. system. Bact.* 27, 44-57 (1977).

Fox, G.E., Stackebrandt, E., Hespell, R.B., Gibson, J., Maniloff, J., Dyer, T.A., Wolfe, R.S., Balch, W.E., Tanner, R.S., Magrum, L.J., Zablen, L.B., Blakemore, R., Gupta, R., Bonen, L., Lewis, B.J., Stahl, D.A., Luehrsen, K.R., Chen, K.N., Woese, C.R.: The phylogeny of prokaryotes. *Science* 209, 457-463 (1980).

Garvie, E.I.: The genus *Leuconostoc* and its nomenclature. *J. Dairy Res.* 27, 283-292 (1960).

Garvie, E.I.: *Leuconostoc oenos* sp. nov. *J. gen. Microbiol.* 48, 431-438 (1967).

- Garvie, E.I.: Genus *Leuconostoc* Van Tiegham. In: Bergey's Manual of Determinative Bacteriology (Buchanan, R.E., Gibbons, N.E., eds.), 510-513 8th ed. The Williams and Wilkins Co., Baltimore 1974.
- Garvie, E.I., Zezula, V., Hill, V.A.: Guanine plus cytosine content of the deoxyribonucleic acid of leuconostocs and some heterofermentative lactobacilli. *Int. J. system. Bact.* 24, 248-251 (1974).
- Garvie, E.I.: Hybridization between the deoxyribonucleic acids of some strains of heterofermentative lactic acid bacteria. *Int. J. system. Bact.* 26, 116-122 (1976).
- Garvie, E.I., Farrow, J.A.E.: Sub-divisions within the genus *Streptococcus* using deoxyribonucleic acid/ribosomal ribonucleic acid hybridization. *Zbl. Bakt. Hyg., I. Abt. Orig. C2*, 299-310 (1981).
- Garvie, E.I.: *Leuconostoc mesenteroides* subsp. *cremoris* (Knudsen and Sørensen) comb. nov. and *Leuconostoc mesenteroides* subsp. *dextranicum* (Beijerinck) comb. nov. *Int. J. system. Bact.* 33, 118-119 (1983).
- Gasser, F., Sebald M.: Composition en bases nucléiques des bactéries du genre *Lactobacillus*. *Ann. Inst. Pasteur* 110, 261-275 (1966).
- Gasser, F., Gasser, C.: Immunological relationships among lactic dehydrogenases in the genera *Lactobacillus* and *Leuconostoc*. *J. Bact.* 106, 113-125 (1971).
- Gasser, F., Hontebeyrie, M.: Immunological relationships of glucose-6-phosphate dehydrogenase of *Leuconostoc mesenteroides* NCDO 768 (= ATCC 12291). *Int. J. system. Bact.* 27, 6-8 (1977).

- Gasser, F. Janvier M.: Deoxyribonucleic acid homologies of *Lactobacillus jensenii*, *Lactobacillus leichmannii* and *Lactobacillus acidophilus*. *Int. J. system. Bact.* 30, 28-30 (1980).
- Gawehn, K., Bergmeyer, H.U.: D-(-)-Lactat. In: *Methoden der enzymatischen Analyse II* (H.U. Bergmeyer, Hrsg.) 3. Auflage, 1538-1541, Verlag Chemie, Weinheim 1974.
- Gillis, M., De Ley, J., De Cleene, M.: The determination of molecular weight of bacterial genome DNA from renaturation rates. *Eur. J. Biochem.* 12, 143-153 (1970).
- Gutmann, J., Wahlefeld, A.W.: L-(+)-Lactat: Bestimmung mit Lactat-Dehydrogenase und NAD. In: *Methoden der enzymatischen Analyse II* (H. U. Bergmeyer, Hrsg.), 3. Auflage, 1510-1514, Verlag Chemie, Weinheim 1974.
- Hammes, W., Schleifer, K.H., Kandler, O.: Mode of action of glycine on the biosynthesis of peptidoglycan. *J. Bact.* 116, 1029-1053 (1973).
- Heath, E.C., Hurwitz, J., Horecker, B.L., Ginsburg, A.: Pentose fermentation by *Lactobacillus plantarum*. I. The cleavage of xylulose-5-phosphate by phosphoketolase. *J. biol. Chem.* 231, 1009-1029 (1958).
- Hemme, D., Raibaud, P., Ducluzeau, R., Galpin, J.V., Sicard, Ph., Van Heijenoort, J.: *Lactobacillus murinus* n.sp., une nouvelle espèce de la flore dominante autochtone du tube digestif du rat et de la souris. *Ann. Microbiol. (Inst. Pasteur)* 131 A, 297-308 (1980).

Henneberg, W.: Zur Kenntnis der Milchsäurebakterien der Brenneireimaische, der Milch und des Bieres. (*Bacillus delbrücki* (Leichmann), *Bacillus delbrücki* var. α n. sp., *Pediococcus lactis acidii* (Lindner), *Bacillus lactis acidii* (Leichmann), *Bacterium lactis acidii* (Leichmann), *Saccharobacillus pastorianus* (v.Laer), *Saccharobacillus pastorianus* var. α n. sp., *Saccharobacillus pastorianus* var. *berolinensis* n. sp. *Bacillus lindneri* n. sp.). Wochenschr. Brau. 18, 381-384 (1901).

Henneberg, W.: Handbuch der Gärungsbakteriologie. 2., neubearbeitete und vermehrte Auflage 2. Band, spezielle Pilzkunde, Berlin (1926).

Holland, D.F.: The families and genera of the bacteria. J. Bact. 5, 191-229 (1920).

Holz, G., Bergmeyer, H.U.: Acetat: Bestimmung mit Acetatkinase und Hydroxylamin. In: Methoden der enzymatischen Analyse II (H. U. Bergmeyer, Hrsg.) 3. Auflage, 1574-1578, Verlag Chemie, Weinheim 1974.

Holzappel, W.H.: Aminosäuresequenz des Mureins und Taxonomie der Gattung *Leuconostoc*. Dissertation, Universität München (1969).

Holzappel, W., Kandler, O.: Zur Taxonomie der Gattung *Lactobacillus* Beijerinck. VI. *Lactobacillus coprophilus* subsp. *confusus* nov. subsp., eine neue Unterart der Untergattung *Betabacterium*. Zbl. Bakt. Parasitenk. Infektionskr. Abt. II. 123, 657-666 (1969).

Holzappel, W.H., Van Wyk, E.P.: *Lactobacillus kandleri* sp. nov., a new species of the subgenus *Betabacterium*, with glycine in the peptidoglycan. Zbl. Bakt. Hyg., I. Abt. Orig. C 3, 495-502 (1982).

- Holzappel, W.H., Gerber, E.S.: *Lactobacillus divergens* sp. nov., a new heterofermentative *Lactobacillus* species producing L(+)-lactate. *System. Appl. Microbiol.* 4, 522-534 (1983).
- Hontebeyrie, M., Gasser, F.: Comparative immunological relationships of two distinct sets of isofunctional dehydrogenases in the genus *Leuconostoc*. *Int. J. system. Bact.* 25, 1-6 (1975).
- Hontebeyrie, M., Gasser, F.: Deoxyribonucleic acid homologies in the genus *Leuconostoc*. *Int. J. system. Bact.* 27, 9-14 (1977).
- Hucker, G.J., Pederson, C.S.: A study of the physiology and classification of the genus *Leuconostoc*. *Zbl. Bakt. II.* 85, 65-114 (1931).
- Huss, V.A.R., Festl, H., Schleifer, K.H.: Studies on the spectrophotometric determination of DNA hybridization from renaturation rates. *System. Appl. Microbiol.* 4, 184-192 (1983).
- Johnson, J.L.: Use of nucleic-acid homologies in the taxonomy of anaerobic bacteria. *Int. J. system. Bact.* 23, 308-315 (1973).
- Kagermeier, A.: Taxonomie und Vorkommen von Milchsäurebakterien in Fleischprodukten. Dissertation, Universität München (1981).
- Kandler, O.: Amino acid sequence of the murein and taxonomy of the genera *Lactobacillus*, *Bifidobacterium*, *Leuconostoc* and *Pediococcus*. *Int. J. system. Bact.* 20, 491-507 (1970).
- Kandler, O., Schleifer, K.H.: Systematics of bacteria. *Progress in Botany* 42, 234-252 (1980).

- Kandler, O., Kunath, P.: *Lactobacillus kefir* sp. nov., a component of the microflora of kefir. *System. Appl. Microbiol.* 4, 286-294 (1983).
- Kandler, O., Schillinger, U., Weiss, N.: *Lactobacillus bifermens* sp. nov., nom. rev., an organism forming CO₂ and H₂ from lactic acid. *System. Appl. Microbiol.* 4, 408-412 (1983).
- Kandler, O., Weiss, N.: Genus *Lactobacillus*. In: *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*, Vol. II (P.H.A. Sneath and J.G. Holt, eds.). The Williams and Wilkins Co., Baltimore (in press, 1985).
- Kilpper-Bälz, R., Fischer, G., Schleifer, K.H.: Nucleic acid hybridization of group N and group D streptococci. *Current Microbiology* 7, 245-250 (1982).
- Kitahara, K.: A new type of lactic acid bacteria. *Bulletin Research Institute Food Science, Kyoto University* 2, 23-36 (1949).
- Kluyver, A.J.: Die bakteriellen Zuckervergärungen. *Ergeb. Enzymforschung* 4, 230-273 (1935).
- Kohne, D.E.: Isolation und characterization of bacterial ribosomal RNA cistrons. *Biophys. J.* 8, 1104-1118 (1968).
- Köhl, R.: Vergleichende biochemische Untersuchungen an Stämmen von *Lactobacillus fermentum* und *Lactobacillus reuteri* nov. spec. Diplomarbeit, Universität München (1972).
- Krasil'nicov, N.A.: Guide to the bacteria and actinomycetes. Akad. Nauk SSSR, Moskau (1949).

Kunath, P.: Die Mikroflora von Kefir. Dissertation, Universität München 1983.

Lauer, E., Helming, C., Kandler, O.: Heterogeneity of the species *Lactobacillus acidophilus* (Moro) Hansen and Moquot as revealed by biochemical characteristics and DNA-DNA-Hybridization. Zbl. Bakt. Hyg., I. Abt. Orig. C1, 150-168 (1980).

London, J., Meyer, E.Y., Kulczyk, S.: Comparative biochemical and immunological study of malic enzyme from two species of lactic acid bacteria: evolutionary implications. J. Bact. 106, 126-137 (1971).

London, J., Kline, K.: Aldolase of lactic acid bacteria: a case history in the use of an enzyme as an evolutionary marker. Bact. Rev. 37, 453-478 (1973).

London, J., Chace, N.M.: Relationships among lactic acid bacteria demonstrated with glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase as an evolutionary probe. Int. J. system. Bact. 33, 723-737 (1983).

Mandel, M., Marmur, J.: Use of ultraviolet absorbance-temperature profile for determining the guanine plus cytosine content of DNA. In: Methods in Enzymology XIIB, (L. Grossman and K. Moldave, eds.) 195-206, Academic Press, New York - London 1968.

Mandel, M.: New approaches to bacterial taxonomy: perspective and prospects. Ann. Rev. Microbiol. 23, 239-274 (1969).

Maurer, H.R.: Disk-Elektrophorese. Walter de Gruyter Verlag, Berlin 1968.

- McConaughy, B.L., Laird, C.D., McCarthy, B.J.: Nucleic acid reassociation in formamide. *Biochemistry* 8, 3289-3295 (1969).
- Nakamura, L.K., Crowell, C.D.: *Lactobacillus amylophilus*, a new starch-hydrolysing species from swine waste-corn fermentation. *Dev. Ind. Microbiol.* 20, 531-540 (1979).
- Niven, C.F., Evans, J.B.: *Lactobacillus viridescens* nov. spec., a heterofermentative species that produces a green discoloration of cured meat pigments. *J. Bact.* 73, 758-759 (1957).
- Ohmayer, G., Precht, M., Seiler, H., Busse, M.: Linkage-maps and their relations to linkage cluster procedures. *Zbl. Bakt. II. Abt.* 135, 22-37 (1980).
- Okada, S., Suzuki, Y., Kozaki, M.: A new heterofermentative *Lactobacillus* species with meso-diaminopimelic acid in peptidoglycan, *Lactobacillus vaccिनostercus* Kozaki and Okada sp. nov. *J. gen. appl. Microbiol.* 25, 215-221 (1979).
- Orla-Jensen, S.: The lactic acid bacteria. Copenhagen, Andr. Fred. Høst & Søn (1919).
- Pederson, C.: The gas -producing species of the genus *Lactobacillus*. *J. Bact.* 35, 96-108 (1938).
- Pette, J.W., Van Beynum, J.: Boekelscheurbacterien Rijkslandbouwproefstation te hoorn. Versl. Landbouwk Onderz. 49C, 315-346 (1943).
- Prager, E.M., Wilson, A.C.: The dependence of immunological cross-reactivity upon sequence resemblance among lysozymes. *J. Biol. Chem.* 246, 7010-7017 (1971).

- Reuter, G.: Laktobazillen und eng verwandte Mikroorganismen in Fleisch und Fleischerzeugnissen. 2. Mitteilung: Die Charakterisierung der isolierten Laktobazillenstämme. Fleischwirtschaft 50, 954-962 (1970).
- Rhuland, L.E., Work, E., Deham, R.F., Hoare, D.S.: The behaviour of the isomers of α,ϵ -diaminopimelic acid on paper chromatograms. J. Amer. Chem. Soc. 77, 4844-4846 (1955).
- Rogosa, M., Sharpe, M.E.: An approach to the classification of the lactobacilli. J. appl. Bact. 22(3), 329-340 (1959).
- Rogosa, M., Franklin, J.G., Perry, K.D.: Correlation of the vitamin requirements with cultural and biochemical characters of *Lactobacillus* ssp. J. gen. Microbiol. 25, 473-482 (1961).
- Rogosa, M.: Characters used in the classification of lactobacilli. Int. J. system. Bact. 20, 519-533 (1970).
- Sammon, J.M.: A nonlinear mapping for data structure analysis. IEEE Transaction on computers C 18, 401-409 (1969).
- Schleifer, K.H., Kandler, O.: Zur chemischen Zusammensetzung der Zellwand der Streptokokken. I. Die Aminosäuresequenz des Mureins von *Sc.thermophilus* und *Sc.faecalis*. Arch. Microbiol. 57, 335-364 (1967).
- Schleifer, K.H., Stackebrandt, E.: Molecular systematics of prokaryotes. Ann. Rev. Microbiol. 37, 143-187 (1983).
- Schleifer, K.H., Kilpper-Bälz, R.: Transfer of *Streptococcus faecalis* and *Streptococcus faecium* to the genus *Enterococcus* nom. rev. as *Enterococcus faecalis* comb. nov. and *Enterococcus faecium* comb. nov. Int. J. system. Bact. 34, 31-34 (1984).

- Schwarz, Z., Kössel, H.: The primary structure of 16s -rDNA from *Zea mays* chloroplasts is homologous to *E.coli* 16s -rRNA. *Nature* 283, 739-742 (1980).
- Schwartz, R.M., Dayhoff, M.O.: Origins of prokaryotes, eukaryotes, mitochondria and chloroplasts (A perspective is derived from protein and nucleic acid sequence data). *Science* 199, 395-403 (1978).
- Seiler, H., Ohmayer, G., Busse, M.: Taxonomische Untersuchung an Gram-positiven coryneformen Bakterien unter Anwendung eines EDV-Programmes zur Berechnung von Vernetzungsdiagrammen. *Zbl. Bakt. Hyg. I Orig. A* 238, 475-488 (1977).
- Sharpe, M.E.: Taxonomy of the lactobacilli. *Dairy Science Abstracts* 24, 109-118 (1962).
- Sharpe, M.E., Garvie, E.I., Tilbury, R.H.: Some slime-forming heterofermentative species of the genus *Lactobacillus*. *Appl. Microbiol.* 23, 389-397 (1972).
- Sharpe, M.E., Dellaglio, F.: Deoxyribonucleic acid homology in anaerobic lactobacilli and in possibly related species. *Int. J. system. Bact.* 27, 19-21 (1977).
- Siegel, J.L., Hurst, S.F., Liberman, E.S., Coleman, S.E., Bleiweis, A.S.: Mutanolysin-induced spheroplasts of *Streptococcus mutans* are true protoplasts. *Infect. Immun.* 31, 808-815 (1981).
- Skerman, V.B.D., McGowan, V., Sneath, P.H.A.: Approved lists of bacterial names. *Int. J. system. Bact.* 30, 225-420 (1980).

- Sneath, H.A., Sokal, R.R.: Numerical taxonomy. Freeman and Company, San Francisco (1973).
- Spicher, G., Schröder, R.: Die Mikroflora des Sauerteiges. IV. Mitt.: Untersuchungen über die Art der in "Reinzuchtsauern" anzutreffenden stäbchenförmigen Milchsäurebakterien (Genus *Lactobacillus* Beijerinck). Z. Lebensm. Unters. Forsch. 167, 343-354 (1978).
- Spicher, G., Rabe, E.: Der Einfluß der Parameter der Sauerteigbereitung auf die Bildung von Milch- und Essigsäure durch homo- und heterofermentative Sauerteigbakterien. Alimenta 22, 67-71 (1983).
- Stackebrandt, E., Kandler, O.: Taxonomy on the genus *Cellulomonas*, based on phenotypic characters and deoxyribonucleic acid-deoxyribonucleic acid homology, and proposal of seven Neotype strains. Int. J. system. Bact. 29, 273-282 (1979).
- Stackebrandt, E., Fowler, V.J., Woese, C.R.: A phylogenetic analysis of *Lactobacilli*, *Pediococcus pentosaceus* and *Leuconostoc mesenteroides*. System. Appl. Microbiol. 4, 326-337 (1983).
- Stackebrandt, E., Ludwig, W., Fox, G.E.: 16S ribosomal RNA oligonucleotide cataloging. In: Methods in Microbiology (in press, 1985).
- Stetter, K.O.: Physiologisch-biochemische Untersuchungen zur Bildung von Milchsäuregemischen bei *Lactobacillen*. Dissertation, Universität München (1973).

- Vescovo M., Dellaglio, F., Bottazzi, V., Sarra, P.G.: Deoxyribonucleic acid homology among *Lactobacillus* species of the subgenus *Betabacterium* Orla-Jensen. *Microbiologica* 2, 317-330 (1979).
- Weiss, N., Schillinger, U., Laternser, M., Kandler, O.: *Lactobacillus sharpeae* sp. nov. and *Lactobacillus agilis* sp. nov., two new species of homofermentative, meso-diaminopimelic acid-containing lactobacilli isolated from sewage. *Zbl. Bakt. Hyg., I. Abt. Orig. C* 2, 242-253 (1981).
- Weiss, N., Schillinger, U., Kandler, O.: *Lactobacillus trichodes* and *Lactobacillus heterohiochii*, subjective synonyms of *Lactobacillus fructivorans*. *System. Appl. Microbiol.* 4, 507-511 (1983).
- Weiss, N., Schillinger, U., Kandler, O.: *Lactobacillus lactis*, *Lactobacillus leichmannii* and *Lactobacillus bulgaricus*, subjective synonyms of *Lactobacillus delbrueckii*, and description of *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *lactis* comb. nov. and *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* comb. nov. *System. Appl. Microbiol.* 4, 552-557 (1983).
- Whittenbury, R.: A study of the genus *Leuconostoc*. *Arch. Mikrobiol.* 53, 317-327 (1966);
- Williams, R.A.D., Sadler, S.A.: Electrophoresis of glucose-6-phosphate dehydrogenase, cell wall composition and the taxonomy of heterofermentative lactobacilli. *J. gen. Microbiol.* 65, 351-358 (1971).

- Yokogawa, K., Kawata, S., Takemura, T., Yoshimura, Y.:
Purification and properties of lytic enzymes from *Streptomyces*
globisporus 1829. *Agr. Biol. Chem.* 39, 1533-1543 (1975).
- Zuckerkindl, E., Pauling, L.: Molecules as documents of
evolutionary history. *J. Theor. Biol.* 8, 357-366 (1965).

Die vorliegende Arbeit wurde am Institut für Botanik der Ludwig-Maximilians-Universität München unter Leitung von Professor Dr. O. Kandler von Juni 1981 bis Februar 1985 angefertigt.

Herrn Prof. Dr. O. Kandler danke ich für das stete Interesse an meiner Arbeit, die wertvollen Anregungen und nützlichen Diskussionen.

Herrn Dr. N. Weiss möchte ich für die vielen praktischen Hinweise danken.

Weiterhin gilt mein Dank Herrn Prof. Dr. M. Busse und Herrn Braatz (Bakteriologisches Institut der Süddeutsch. Versuchs- und Forschungsanstalt für Milchwirtschaft, Technische Universität München, Freising-Weihenstephan) für die Computerauswertungen.

Herr Prof. Dr. E. Stackebrandt (Universität Kiel) danke ich für die Einweisung in die Technik der 16S rRNA-Partialsequenzierung.

Schließlich möchte ich mich bei allen kollegialen Mitarbeitern und besonders bei Frau C. Matzenbacher für ihre sorgfältige Assistenz bedanken.

Lebenslauf

1. Angaben zur Person:

Name:	Schillinger, Ulrich
Geburtsdatum:	23.1.56
Geburtsort	München
Eltern:	Ruth und Werner Schillinger
Staatsangehörigkeit:	deutsch
Familienstand:	ledig

2. Schulbildung:

1962 - 1966	Volksschule an der Rotbuchenstraße in München
1966 - 1975	Albert-Einstein-Gymnasium in München
Juni 1975	Abitur

3. Studium

1975 - 1976	Studium der Biologie an der Universität Hohenheim
1976 - 1980	Studium der Biologie an der Ludwig-Maximilians-Universität in München
1980	Diplomhauptprüfung
1980 - 1981	Diplomarbeit im Fach Mikrobiologie bei Professor Dr. O. Kandler an der LMU München

4. Promotion

1981 - Februar 1985	Promotion am Lehrstuhl für allgemeine Botanik der LMU München unter Leitung von Professor Dr. O. Kandler
---------------------	--

während dieser Zeit Anstellung als wissenschaftliche Hilfskraft

